

Charakterisierung von Hartfettmatrices und Lipidnanosuspensionen mit Phospholipon 90 H

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Riem Hussein
aus Bad Harzburg

1. Referentin:	Professor Dr. Christel Müller-Goymann
2. Referentin:	Professor Dr. Heike Bunjes
eingereicht am:	19.09.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.01.2009
Druckjahr 2009	

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Hussein, R. und Müller-Goymann, C.C., Characterisation of nanoscale dispersions based on triglycerides and hydrogenated lecithin (Phospholipon® 90 H), (Poster), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf (2006).

Hussein, R. und Müller-Goymann, C.C., Long time Stability of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) based on triglycerides and hydrogenated lecithin (Phospholipon® 90 H), (Poster), 3. Zsigmondy Kolloquium, Berlin (2006).

Hussein, R. und Müller-Goymann, C.C., Insulin-loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) based on Phospholipon® 90 H, (Poster), Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig (2008).

Hussein, R. und Müller-Goymann, C.C., Formation of mixed crystals in lipid matrices used for nanoscale dispersions, (Poster), 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (2008).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Professor Dr. Christel Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Professor Dr. Christel Müller-Goymann

danke ich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung in allen Bereichen, eine sehr schöne Zeit am Institut mit einer immer sehr freundlichen Betreuung.

Frau Professor Dr. Heike Bunjes danke ich sehr für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für die schöne Zeit, das angenehme Arbeitsklima, die fachliche Unterstützung und die tollen Erinnerungen, die mich mit dem Institut verbinden.

Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Kirsten Nebelung, Carmen Gröchtemeier, Juliane Schildt, Ursula Jahn, Manuela Handt, Lucia Albrecht, Ulrike Kruse, Karin Becker und Antje Bieder für die Hilfe bei allen experimentellen Arbeiten, sowie Sven Pape bei allen technischen Problemen.

Außerdem danke ich den vielen lieben Kollegen aus dem Arbeitskreis für die stets fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen.

Des Weiteren danke ich der Firma Phospholipid GmbH aus Köln für die freundliche Überlassung von Materialien und die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Außerdem möchte ich Frau Andrea Schmidt von Bruker Optik Ettlingen für die große Hilfestellung bei den FTIR-Experimenten und den durchgeführten Untersuchungen danken.

Ganz besonders möchte ich auch Luma Baydoun für ihre Hilfe bei all meinen Fragen danken.

Mein größter Dank gilt meiner Schwester Fadwa und für all ihre fachliche und administrative Hilfe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem danke ich ihr für die schöne gemeinsame Zeit am Institut.

Zum Schluss danke ich meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern für die Förderung all meiner Wünsche und Ideen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil.....	3
2.1	Phospholipide	3
2.2	Phospholipon 90 H.....	6
2.3	Kolloidale Arzneistoffträgersysteme	7
2.3.1	Feste Lipidnanopartikel	9
3	Material und Methoden	12
3.1	Material.....	12
3.1.1	Lipidmatrices (LM) und Lipidnanosuspensionen (SLN).....	12
3.1.2	Analytik	13
3.2	Methoden	14
3.2.1	Lösungsversuche von P90H	14
3.2.2	Herstellung der Lipidmatrix (LM)	14
3.2.3	Herstellung der SLN.....	14
3.2.4	Variation der SLN-Herstellung.....	15
3.2.5	Herstellung der halbfesten Systeme	16
3.2.6	Partikelgrößenmessung	17
3.2.7	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC).....	17
3.2.7.1	Bestimmung des Kristallinitätsindex (CI)	18
3.2.8	TAM	18
3.2.9	Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD)	18
3.2.10	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	19
3.2.11	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben	19
3.2.12	Rheologische Untersuchungen der halbfesten Systeme.....	20
3.2.13	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der SLN.....	20
3.2.14	Bestimmung des PC- und LPC-Gehaltes der SLN.....	20
3.2.15	Proteinbeladung der SLN.....	21
3.2.15.1	Proteinbeladungskapazität der SLN	21
3.2.15.2	SLN-Beladung mit Insulin	22
3.2.16	Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie	22
3.2.17	Diskontinuierliche Elektrophorese	22
3.2.18	Circulardichroismus (CD)	25

3.2.19	Prüfung auf Sterilität.....	25
3.2.20	Mikrowellenbestrahlung zur Entkeimung von SLN.....	25
4	Versuchsergebnisse und Diskussion.....	27
4.1	Untersuchungen der LM.....	27
4.1.1	Herstellung der LM.....	27
4.1.2	TEM-Aufnahme der LM.....	27
4.1.3	DSC-Untersuchungen.....	28
4.1.4	Bestimmung des Kristallinitätsindex (CI).....	31
4.1.5	TAM-Untersuchungen.....	33
4.1.6	WAXD-Untersuchungen.....	34
4.1.7	SAXD-Untersuchungen.....	35
4.1.8	Zusammenfassende Diskussion der Untersuchungen der LM.....	40
4.2	Untersuchungen der S154-LM mit DMPC und P90H.....	42
4.2.1	Versuche zur Verbesserung der Löslichkeit von P90H.....	42
4.2.2	WAXD-Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H.....	42
4.2.3	SAXD-Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H.....	46
4.2.4	Zusammenfassende Diskussion von Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H.....	48
4.3	Untersuchungen der Präemulsionen.....	50
4.3.1	TEM-Untersuchungen.....	50
4.3.2	WAXD-Untersuchungen unter Konditionierung.....	51
4.3.3	Zusammenfassende Diskussion von Untersuchungen der Präemulsionen.....	52
4.4	Herstellung und Charakterisierung der SLN-Dispersionen.....	53
4.4.1	TEM-Untersuchungen.....	53
4.4.2	Partikelgrößenbestimmung der Standardformulierung.....	54
4.4.3	TAM-Untersuchungen.....	55
4.4.4	Zusammenfassende Diskussion zur Herstellung und Charakterisierung von SLN-Dispersionen.....	56
4.5	Untersuchungen von SLN-Variationen.....	57
4.5.1	Variation des Homogenisators.....	57
4.5.1.1	Partikelgrößenbestimmung.....	57
4.5.1.2	WAXD-Untersuchungen.....	58
4.5.1.3	SAXD-Untersuchungen.....	59

4.5.2	Variation des Konservierungsmittels	60
4.5.2.1	Partikelgrößenbestimmung	60
4.5.3	Variation der Emulgatorkonzentration	63
4.5.3.1	Partikelgrößenbestimmung	63
4.5.3.2	DSC-Untersuchungen	64
4.5.3.3	WAXD-Untersuchungen	65
4.5.3.4	SAXD-Untersuchungen	67
4.5.4	Variation der Homogenisationsdauer	68
4.5.4.1	Partikelgrößenbestimmung	68
4.5.4.2	WAXD-Untersuchungen	69
4.5.4.3	Bestimmung der Phospholipid-Zusammensetzung	71
4.5.4.4	Fettsäure-Zusammensetzung	71
4.5.5	Variation des LM-Anteiles (LM-Solutol 5:1)	73
4.5.5.1	Partikelgrößenbestimmung	74
4.5.6	Variation des LM-Anteiles (Solutol-Gehalt 1 %)	75
4.5.6.1	Partikelgrößenbestimmung	76
4.5.6.2	TEM-Untersuchungen an halbfesten Systemen	77
4.5.6.3	Rheologische Untersuchungen der halbfesten Systeme	79
4.5.6.4	Zusammenfassende Diskussion zu den Untersuchungen von SLN- Variationen	81
4.6	Untersuchungen an unkonservierten SLN-Dispersionen	84
4.6.1	Prüfung auf Sterilität	84
4.6.2	Mikrowellenbestrahlung zur Entkeimung von SLN	84
4.6.3	Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an unkonservierten SLN	86
4.7	Untersuchungen an Protein-beladenen SLN-Dispersionen am Beispiel von BSA und FITC-BSA	88
4.7.1	Partikelgrößenbestimmung	88
4.7.2	SLN-Beladungskapazität von BSA an SLN	89
4.7.3	SLN-Beladungskapazität von FITC-BSA an SLN	89
4.7.4	FTIR-Untersuchungen	93
4.8	Untersuchungen an Protein-beladenen SLN-Dispersionen am Beispiel von Insulin	97
4.8.1	Partikelgrößenbestimmung	97

4.8.2	Diskontinuierliche Elektrophorese	98
4.8.3	CD-Untersuchungen	100
4.8.4	Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Protein- beladenen SLN-Dispersionen.....	101
5	Abschlussdiskussion.....	103
5.1	Untersuchung der LM	103
5.2	Untersuchungen der SLN	104
5.3	Proteinbeladung von SLN-Dispersionen.....	106
6	Zusammenfassung.....	108
7	Literaturverzeichnis	111

1 Einleitung

Feste Lipidnanopartikel (SLN = solid lipid nanoparticles) stellen ein kolloidales, für die parenterale Applikation geeignetes Arzneistoffträgersystem dar. Voraussetzung für eine parenterale Applikation ist u.a. eine gute physiologische Verträglichkeit der Bestandteile [Wissing et al. 2004]. SLN bestehen aus einer Matrix, die sich zumeist aus Hartfett und gegebenenfalls einem amphiphilen Stoff wie beispielsweise Lecithin zusammensetzt [Müller und Lucks 1994]. Arzneistoffe können in diese Matrix inkorporiert bzw. an die Oberfläche adsorbiert werden. Insbesondere die Adsorption von Proteinen an SLN findet zunehmendes Interesse in der Formulierung moderner Drug Delivery Systeme [Almeida et al. 1997; Almeida und Souto 2007]. Mit SLN in einer Arzneistoffzubereitung ist eine kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen aus der Matrix bzw. von der Oberfläche angestrebt [Müller et al. 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurden die SLN auf der Basis von Hartfett hergestellt, welches ein Gemisch verschiedener Triglyceride darstellt. Das zusätzlich eingesetzte Lecithin war - erstmalig in der Arbeitsgruppe - ein vollkommen hydriertes Phospholipid (Phospholipon 90 H (P90H), Phospholipid (D-Köln)). Bisher wurde in früheren Arbeiten Phospholipon 90 G, ein Lecithin mit ungesättigten Fettsäuren, eingesetzt, welches mit steigendem Anteil in nanoskaligen Dispersionen bevorzugt die Partikel hüllenartig umschließt [Schubert et al. 2006]. Aufgrund der hohen Kristallinität der SLN ist nach erfolgter Einarbeitung von Arzneistoffen ein Ausschleusen dieser aus dem hoch geordneten Kristallgitter der Phospholipid 90 G-haltigen Lipidmatrix wahrscheinlich [Müller et al. 2000]. Eine Arzneistoffsolubilisation ist somit nur eingeschränkt möglich. Mit Hilfe des vollständig hydrierten Phospholipon 90 H sollte überprüft werden, ob der Kristallinitätsgrad der Lipidmatrix beeinflusst werden oder gar eine Mischkristallbildung zwischen Hartfett und Lecithin erfolgen könnte.

SLN werden im Allgemeinen durch Hochdruckhomogenisation bei Temperaturen oberhalb des Schmelzpunktes des Lipids hergestellt. Für thermolabile Wirkstoffe, wie auch einige Proteine, bedeutet dies, dass sie erst nach der Herstellung zur Nanosuspension hinzugegeben werden können. Eine erfolgreiche Mikronisierung von Insulin durch Hochdruckhomogenisation wurde jedoch bereits beschrieben [Maschke et al. 2006], so dass eine Beladung der SLN mit Insulin vor der

Hochdruckhomogenisation eine Alternative zur gängigen Arzneistoffbeladung nach der Herstellung darstellen könnte.

Aus den oben genannten Aspekten ergeben sich folgende Ziele dieser Arbeit:

1. Die Entwicklung und physiko-chemische Charakterisierung geeigneter Lecithin-Hartfett-Mischungen, die als Lipidmatrix für die Lipidnanosuspensionen dienen sollten.
2. Die Entwicklung und physiko-chemische Charakterisierung von SLN auf Basis der untersuchten Lipidmatrices.
3. Die Beladung der SLN mit Proteinarzneistoffen vor und nach der Hochdruckhomogenisation und Charakterisierung dieser Protein beladenen Systeme hinsichtlich der Beladungskapazität bzw. Proteinstabilität (Insulin nach Hochdruckhomogenisation).

pflanzlicher oder tierischer Herkunft. Als Material tierischen Ursprungs kommt beispielsweise Eidotter in Frage. Pflanzliche Quellen für PL sind u.a. Sojabohnen, Getreide, Baumwollsamens, Rapssamen und Sonnenblumenkerne [Garei et al. 1994]. Ungesättigte PL sind gängigerweise mit Ölsäure (Zahl der C-Atome:Doppelbindungen 18:1) und Linolsäure (18:2) verestert. Hydrierte PL werden über reduktive Hydrierung aus ungesättigten PL gewonnen [Fahrion 1916].

Zur Isolierung der PL aus pflanzlichen Produkten wird das entsprechende Pflanzenöl, z.B. durch Einleiten geringer Mengen Wasserdampf oder Wasser, entschleimt. Die dabei entstehende Masse, die ca. 10-59 % (m/m) PL aufweist, wird nach unterschiedlichen Verfahren getrocknet, so dass nach der Trocknung ein so genanntes Rohlecithin anfällt [Losch et al 1998]. Sojalecithin ist u.a. aus Di- und Triglyceriden, Phospholipiden, Glykolipiden, freien Fettsäuren und Kohlenhydraten zusammengesetzt [Weber 1981]. Mittels acetonischer Entölung können Neutrallipide, wie beispielsweise Di- und Triglyceride, aus dem Rohlecithin entfernt werden. Das entölte Rohlecithin (auch Reinlecithin genannt) ist ein rieselfähiges Pulver, das einen Phosphatidylcholingehalt von 25-30 % (m/m) besitzt und als Lecithingranulat im Handel erhältlich ist. Das Phosphatidylcholin kann mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren aus dem Roh- oder Reinlecithin angereichert werden. Das Rohlecithin wird beispielsweise mit Alkohol extrahiert und anschließend die alkohollösliche Extraktionsphase über Siliciumdioxid bei erhöhten Temperaturen chromatographiert [Gunther 1984]. Auf diese Art und Weise entsteht eine Masse, die einen hohen Phosphatidylcholingehalt besitzt und abhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung wachs- bzw. pastenartig ist. Die weitere Bearbeitung dieser Produkte bereitet wegen ihrer Konsistenz erhebliche Schwierigkeiten, was sich in einer mangelnden Dosierbarkeit oder in einem Anhaften an Geräteinnenwandungen ausdrückt. Die in den Geräten verbleibenden Rückstände machen eine häufige und aufwendige Reinigung erforderlich.

Um hochreine PL herzustellen, wird das entsprechende Lecithin in Wasser oder einem Alkohol-Wasser-Gemisch fraktioniert. Wässrige Suspensionen eines hochreinen PL können lyophilisiert und somit zu einem homogenen Pulver verarbeitet werden [Takeshi et al. 1990].

PL können unter Ausschluss von organischen Lösungsmitteln enzymatisch hergestellt werden. In diesem Fall wird Phospholipase D (beispielsweise aus der Erdnuss oder der Karotte isoliert) zur hydrolytischen Herstellung von

Phosphatidylsäure aus einem PL-Gemisch in Gegenwart von Wasser und zweiwertigen Metallionen, wie z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} und/oder Zn^{2+} , eingesetzt. Diese Ionen sind notwendig, damit die Phospholipase D Transphosphatidylierungs-Aktivitäten zeigen kann. Die so erhaltene Phosphatidylsäure wird nach der Reaktion aus der wässrigen Phase abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. In einer zweiten Reaktion wird die Phosphatidylsäure mit einer Hydroxylverbindung im Überschuss (z.B. Serin, Cholin, Glycerol oder Ethanolamin) zum gewünschten PL umgesetzt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersionen liegt bei dieser Zweistufen-Herstellung zwischen 4,0 und 9,0 [Hoppe et al. 2003].

Als Verunreinigungen der Diacylphosphatide entstehen Monoacylphosphatide durch hydrolytische Abspaltung einer der beiden Acylgruppen. Sie haben hämolytische Eigenschaften und können auch im isotonischen Medium rote Blutzellen auflösen. Aufgrund dieser Wirkung werden Monoacylphosphatide auch Lysophosphatide (Vorsilbe Lysophosphatidyl-) genannt [Thiele 1979]. Diese sind in im Handel erhältlichen PL-Produkten nur in geringen Konzentrationen erlaubt. Sowohl extrahierte als auch synthetisierte Phospholipide sind auf Reinheit, vor allem auf Abwesenheit von Lysophosphatiden und freien Fettsäuren zu untersuchen. Beide Stoffgruppen stören die Ausbildung geordneter lamellarer Strukturen und begünstigen beispielsweise in Liposomen die Fusion der einzelnen Vesikel unter Verlust des solubilisierten oder eingeschlossenen Materials [Schreier 1982]. Außerdem ist eine Kontrolle der PL auf Oxidationsprodukte jederzeit von Nöten.

Die Auftrennung der PL erfolgte in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts je nach Ladung der Lipide dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten in Chloroform/Methanol/ Wasser bzw. Eisessig oder Ammoniak [Mangold 1961; Taki et al. 1994]. Die Entwicklung ungesättigter PL wurde im Joddampf auf Basis einer Redox-Reaktion durchgeführt [Wagner 1960; Curri et al. 1964]. Heutzutage werden zur Auftrennung von PL vorzugsweise HPLC-Methoden bzw. eine gaschromatographische Auftrennung mit einer anschließenden massenspektroskopischen Identifizierung der Fraktionen eingesetzt (GC-MS) [Griffiths 2003; Komorski et al. 2008]. Mit Hilfe einer GC-MS-Kopplung ist sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über die Fettsäurezusammensetzung der PL möglich. Eine Bestimmung der Gesamt-PL-Menge in einer Probe wird gängigerweise mit einer ^{31}P -NMR-Analytik durchgeführt [Milne und Porter 2001; Song et al. 2008].

PL werden beispielsweise für die Herstellung von Liposomen und festen Lipidnanopartikeln in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt [Diederichs und Müller 1994; Mehnert et al. 1997]. Aufgrund ihrer physiologisch guten Verträglichkeit und Bioabbaubarkeit [Müller und Olbrich 1999] können PL in Arzneistoffträgern sowohl topisch als auch ophthalmologisch und parenteral angewendet werden [Jenning et al. 2000; Kriwet und Müller-Goymann 1995; Glonek et al. 1990; Wissing et al. 2004].

2.2 Phospholipon 90 H

Die Phospholipone der Firma Phospholipid GmbH (D-Köln) stellen reine, feste Sojalecithine mit einem standardisierten Anteil an Phosphatidylcholin (PC) unterschiedlicher Zusammensetzung dar. In Tabelle 2.1 sind alle auf dem Markt erhältlichen Phospholipone mit ihrem PC-Anteil und ihrer Anwendung dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das Phospholipon 90 H (P90H) eingesetzt, welches ein vollständig hydriertes Sojalecithin der Firma Phospholipid GmbH (D-Köln) ist. Es ist laut seiner Spezifikation mit ca. 85 % Stearinsäure und mit ca. 15 % Palmitinsäure verestert. Der hydrophile Anteil des PL besteht aus mind. 90 % Phosphatidylcholin und maximal 4 % Lysophosphatidylcholin.

Tabelle 2.1: Phospholipone in der Übersicht [Phospholipid GmbH].

Phospholipon 90 G	Mind. 94 % Phosphatidylcholin (PC); Einsatz in Nanotechnologie (Liposomen, SLN)
Phospholipon 90 H	Mind. 90 % PC; vollständig hydriert; Einsatz in Nanotechnologie (Liposomen, SLN) Verestert mit ca. 85 % Stearinsäure und ca. 15 % Palmitinsäure
Phospholipon 80	Mind. 73 % PC; Einsatz in Nanotechnologie (Liposomen, SLN)
Phospholipon 80 H	Mind. 60 % PC; vollständig hydriert; Einsatz im Kosmetikbereich
Phospholipon 85 G	Mind. 85 % PC mit geringem Anteil an Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin
Phospholipon 100 H	Chromatographisch reines PC, vollständig hydriert

Die Phospholipone werden über einen Fraktionierungsprozess aus Rohlecithin hergestellt. Die gesättigten Phospholipone entstehen durch reduktive Hydrierung der ungesättigten Fettsäurereste. P90H im Speziellen wird beispielsweise für die

Herstellung liposomaler und nanopartikulärer Arzneistoffträger eingesetzt, welche kutan, okular oder auch parenteral appliziert werden können [Agarwal et al. 2001; Agarwal et al. 2002; Bhatia 2004; Brandl et al. 1990; Mezei und Meisner 1993; Zimmer et al. 1999].

2.3 Kolloidale Arzneistoffträgersysteme

Die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe ist häufig nicht ausreichend, um einen ausreichenden Therapieerfolg zu gewährleisten. Sind in-vitro-Untersuchungen dieser Arzneistoffe noch sehr erfolgversprechend, so können diese Ergebnisse *in vivo* oftmals nicht reproduziert werden [Emami 2006; Hüttenrauch und Speiser 1985; Polli et al. 1996]. Es gibt zahlreiche Gründe dafür, z.B. zu geringe Arzneistoffkonzentrationen im Blut aufgrund unzureichender Resorption, zu schneller Metabolisierung und Elimination (beispielsweise bei Proteinen und Peptiden) [Bradford und Taylor 1999; Hauss et al. 1998; Parsons 1977]. Die Umverteilung vom Zielgewebe weg in andere Kompartimente des Körpers stellt bei toxischen Arzneistoffen eine bedenkliche Gefährdung dar [Ruiz-Garcia et al. 2008]. Ein weiteres Problem vieler Arzneistoffe ist die schlechte Löslichkeit im wässrigen Medium, was eine i.v.-Applikation einer wässrigen Arzneistofflösung ausschließt [Bergström et al. 2007]. Auffällige Veränderungen des Plasmaspiegels aufgrund einer unvorhersehbaren Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe nach oraler Anwendung, einschließlich des Nahrungsmiteleinflusses auf die Plasmaspiegel, wie z.B. bei Cyclosporinen, sind für die Arzneimittelsicherheit untragbar [Noble und Markham 1995]. Aufgrund dieser aufgezählten Probleme wurden entsprechende Arzneistoffträger entwickelt, die einen Einfluss auf das in vivo-Verhalten von Arzneistoffen haben [Müller und Hildebrand 1998]. Die Größe des Arzneistoffträgersystems ist von der gewünschten Applikationsart abhängig. Sie reicht vom Nanometerbereich (kolloidale Arzneistoffträger oder auch Nanodrugs) bis in den Mikrometer- (Mikropartikel) und Millimeterbereich (Implantate) [Couvreur et al. 1995; Allémann et al. 1998; Fahr und Kissel 1998; Sershen und West 2002; Panyam und Labhasetwar 2003; Keck und Müller 2006]. Kolloidale Arzneistoffträger, wie z.B. SLN, Liposomen und Polymer-Nanopartikel, sind für eine parenterale Applikation geeignet [Gareißen et al. 1995; Allen 1998]. Voraussetzung dafür ist eine Partikelgröße im Nanometerbereich [Couvreur und Vauthier 2006]. Weitere wichtige Bedingungen für die Entwicklung kolloidaler Arzneistoffträger sind u.a. eine ausreichende Beladungskapazität und das Vermögen der Systeme, den Arzneistoff ins Zielgewebe oder Zielorgan zu transportieren (Drug

Targeting) [Moghimi et al. 2001; Medina et al. 2004]. Außerdem sollten eine möglichst geringe Toxizität der eingesetzten Substanzen, bestenfalls eine Bioabbaubarkeit der Systeme [Gómez-Lopera et al. 2001], eine ausreichende physikalische und chemische Lagerstabilität, sowie eine mögliche und finanzierbare Produktion im Großmaßstab [Gohla und Dingler 2001; Mehnert und Mäder 2001] möglich sein.

Liposomen sind vesikuläre Systeme auf Phospholipidbasis. Aufgrund ihrer doppelschichtigen Anordnung können lipophile Arzneistoffe in den Bilayeranteilen und hydrophile Arzneistoffe im inneren Wasserkern verteilt werden [Diederichs und Müller 1994; Glavaš-Dodov et al. 2004]. Die Arzneistofffreisetzung, die *in vivo*-Stabilität und -Verteilung werden unter anderem von der Partikelgröße und -ladung beeinflusst [Senior 1987; Gabizon et al. 1990; Samad et al. 2007]. Mit Macrogol sterisch stabilisierte Liposomen (so genannte Stealth-Liposomen) zeigen eine Verbesserung der Drug-Targeting-Eigenschaften dieser Arzneistoffträger, da diese modifizierten Liposomen sich einer schnellen Phagozytose entziehen und besser in das Tumorgewebe gelangen können [Torchilin 1985; Voigt 2006; Patil et al. 2008]. Ein Beispiel ist das im Handel erhältliche Caelyx, bei dem Doxorubicin in Macrogol stabilisierten Liposomen verkapselt ist [Gabizon et al. 2003; Molineux 2003; O'Brien et al. 2004]. Liposomale Arzneistoffträger erlauben eine parenterale Applikation schwer wasserlöslicher Arzneistoffe mit gleichzeitiger Verringerung der Toxizität [Belazsovits et al. 1989; Massing und Fuxius 2000; Arikan und Rex 2001]. Als Beispiel ist die seit 1994 in Europa zugelassene liposomale Amphotericin B-Zubereitung AmBisome zu nennen [Janknecht et al. 1992]. Neben der Solubilisierbarkeit des Arzneistoffs können bei gleichem pharmakologischen Effekt nachweislich auftretende Toxizitäten, wie z.B. die Nephrotoxizität, reduziert werden [Bekersky et al. 1999]. Im Vergleich zu einer mizellaren Amphotericin B-Formulierung beträgt die Toxizität des liposomalen Produkts nur ein Zehntel. Allerdings neigen Liposomen zu physikalischen Instabilitäten, was sich beispielsweise in einer Aggregation der Vesikel äußern und zu einer Vergrößerung der Partikel vom Nano- in den Mikrometerbereich führen kann [Fonseca et al. 1997]. Dieses Phänomen ist in Hinblick auf eine parenterale Applikation der Liposomenformulierung nicht akzeptabel.

2.3.1 Feste Lipidnanopartikel

Feste Lipidnanopartikel besitzen einen mittleren Partikeldurchmesser von ca. 80 - 400 nm. Sie bestehen aus einer festen Lipidmatrix, die aus einem Hartfett (z.B. Softisan- oder Witepsol-Produkte) und einem Phospholipid (z.B. Phospholipon- oder Lipoid-Produkte) zusammengesetzt sein kann [Schwarz und Mehnert 1997; Westesen et al. 1997; Schubert und Müller-Goymann 2003]. SLN vereinen die Vorteile von Nanopartikeln auf Polymerbasis und O/W-Fettemulsionen für die parenterale Anwendung [Wissing et al. 2004], nämlich eine feste Lipidmatrix für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung und physiologisch gut verträgliche und möglichst bioabbaubare Inhaltsstoffe [Smith und Hunneyball 1986; Müller et al. 1996; Schmitt 1998; Siekmann und Westesen 1998]. Gleichzeitig werden die Nachteile der beiden Arzneiformen vermieden: Anders als bei den Polymer-Nanopartikeln, die häufig unter Einfluss von organischen Lösungsmitteln hergestellt werden [Niwa et al. 1993; Murakami et al. 1999], arbeitet man bei der SLN-Herstellung im wässrigen Medium [Schwarz et al. 1994]. Außerdem ist eine unerwünschte, plötzliche Arzneistofffreisetzung, die bei den Emulsionen oft problematisch ist, aus den SLN nicht zu erwarten [Cox et al. 1998; zur Mühlen et al. 1998]. Die Herstellung der SLN kann auf verschiedene Arten erfolgen. Als häufigste Herstellungsmethode wird die Hochdruckhomogenisation unter Verwendung eines Kolben-Spalt-Homogenisators eingesetzt [Lippacher et al. 2004]. Bei variablen Druck- und Temperaturbedingungen ist eine Partikelzerkleinerung und eine enge Partikelgrößenverteilung der Formulierung möglich [Hou et al. 2003]. Die Homogenisation findet optimalerweise oberhalb der Schmelztemperatur der Lipide statt [Attama et al. 2007]. Eine Herstellung im Großmaßstab ist mit dieser Methode leicht möglich [Müller und Lucks 1996].

Eine weitere Herstellungsmethode von SLN ist die Mikroemulsionstechnik, bei der Mikroemulsionen aus Lipid, Tensid und Co-Tensid zu Wasser hinzugeben werden, was zur Präzipitation des Lipids und zur Bildung kleiner Partikel führt [Gasco 1993]. Voraussetzung dafür ist, dass das Lipid zur Herstellung der Mikroemulsion geschmolzen sein muss, um dann in kaltes Wasser gegeben zu werden [Gasco 1997]. Verwendet man statt einer Mikroemulsion eine Lipidlösung in organischem Lösungsmittel (z.B. Ethanol oder Isopropanol) und spritzt diese Lösung schnell in eine wässrige Emulgatorlösung, kommt es zu einer Präzipitation des zuvor molekular dispers gelösten Lipids im Nanometerbereich [Schubert und Müller-Goymann 2003].

Diese Methode (Solvent Injection) ist leicht durchführbar, allerdings kann auf die Anwesenheit organischer Lösungsmittel nicht verzichtet werden.

Bei der Lösungsmittelverdampfung (Solvent Evaporation) bzw. Nanopräzipitation wird die Lipidmatrix in einem lipophilen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel (z.B. Chloroform) gelöst, welches in Wasser emulgiert wird [Bauer et al. 2002; Chorny et al. 2002]. Bei erniedrigtem Druck verdunstet das organische Lösungsmittel unter Präzipitation des Lipids in der wässrigen Phase [Sjöström und Bergenstahl 1992; Siekmann und Westesen 1996]. Diese Methode funktioniert völlig ohne Einfluss von Wärme, allerdings muss ihre Anwendung aufgrund möglicher Lösungsmittelrückstände kritisch betrachtet werden. Aus diesem Grund ist eine Weiterentwicklung dieser Herstellungsmethode erfunden worden, bei der man im ersten Schritt ebenfalls eine O/W-Emulsion herstellt, die aus Wasser und mit Wasser teilweise mischbaren und wenig toxischen Lösungsmitteln, wie z.B. Benzylalkohol, besteht [Kawashima et al. 1998; Hu et al. 2002]. Zu dieser Emulsion wird das fünffache Volumen an Wasser gegeben, um das Lösungsmittel aus der Innenphase in die wässrige Außenphase diffundieren zu lassen. Die Nanopartikel präzipitieren anschließend und werden durch Ultrazentrifugation von Lösungsmittelrückständen befreit [Sah 2000; Trotta et al. 2001; Trotta et al. 2003].

Da oftmals eine parenterale Applikation angestrebt wird, werden an die SLN hohe Anforderungen in Bezug auf die Sterilisierbarkeit während und nach der Herstellung gestellt. Eine Sterilisation mit Entkeimungsfiltern lässt sich bei Partikelgrößen von unter 200 nm nur mit sehr hohem Druck und über 200 nm gar nicht realisieren [Tabatt 2002]. Eine Strahlensterilisation mit γ -Strahlung kann zu einer Bildung von freien Radikalen mit großem Energiegehalt führen, was eine chemische Veränderung der Probe bewirken kann. Hitzesterilisationsmaßnahmen führen häufig zu einer Partikelaggregation und einer damit einhergehenden Abnahme der physikalischen Stabilität [Schwarz et al. 1994].

Die Stabilisierung von SLN erfolgt zumeist mit Emulgatoren in möglichst geringer Konzentration [Siekmann und Westesen 1994; Schubert und Müller-Goymann 2005]. Die Nanosuspensionen können auf diese Weise vor der Agglomeration oder auch Aggregation geschützt werden. Allerdings können sich Temperaturveränderungen auf die Verteilung des Emulgators auswirken, was zu einem Stabilitätsverlust der Nanosuspensionen führen kann. Um die Lagerstabilität der SLN-Dispersionen weiterhin zu gewährleisten und mögliche Hydrolyseerscheinungen von Arzneistoffen

zu minimieren, ist die Gefriertrocknung unter Zuhilfenahme von Kryoprotektoren, wie z.B. Trehalose, möglich. Nach Dispergieren der gefriergetrockneten Nanosuspension lässt sich allerdings größtenteils eine Partikelvergrößerung feststellen, die mit einer Vergrößerung der Partikelgrößenverteilung einhergeht [Cavalli et al. 1997; Heiati et al. 1998].

SLN können als Arzneistoffträgersystem vielfältig eingesetzt werden [Gasco 2007]. Die Arzneistoffe werden entweder in die SLN inkorporiert oder an die Oberfläche der Nanopartikel adsorbiert [Almeida et al. 1997; Almeida und Souto 2007]. Die Applikationsmöglichkeiten reichen von der parenteralen [Zara et al. 2002; Shenoy et al. 2005; Lu et al. 2006] über die dermale [Jenning 1999; Müller et al. 2002; Wissing und Müller 2002; Villalobos-Hernandez und Müller-Goymann 2006], transdermale [Priano et al. 2007], orale [Hu et al. 2004], duodenale [Cavalli et al. 2003] bis hin zur okulären Anwendung [Cavalli et al. 2002; Manjunath 2005]. Parenteral verabreichte SLN sollen wie die Liposomen im Optimalfall den Arzneistoff ins Zielgewebe transportieren (Drug Targeting) [Weyhers 1995]. Parenteral verabreichte Arzneistoffe sind beispielsweise Prednisolon [zur Mühlen und Mehnert 1998], Tetracain und Etomidat [zur Mühlen et al. 1998] oder auch Idarubicin und Doxorubicin [Cavalli et al. 1993]. Je nach Oberflächenbeschaffenheit der SLN ist ein Transport des Arzneistoffes ins Gehirn möglich [Kreuter et al. 1997]. Grenzflächenaktive Stoffe, welche sich an der Oberfläche der Nanopartikel befinden, bewirken eine Plasmaproteinbindung und sorgen für eine passive Diffusion der SLN durch die Blut-Hirn-Schranke [Göppert und Müller 2003; Göppert und Müller 2005].

Technologisch sehr interessant sind mit Protein beladende SLN, die beispielsweise in der Immun-, Diabetes- oder auch Krebsforschung eingehend untersucht werden. Die Proteine werden in der Regel erst nach erfolgter SLN-Herstellung an der Oberfläche der Partikel adsorbiert, da eine Hochdruckhomogenisation oberhalb des Schmelzpunktes der Lipide zur Arzneistoffzersetzung führen kann [Weyhers 1995], aber nicht unbedingt muss [Maschke et al. 2006; Hussein und Müller-Goymann 2008]. Aufgrund der Vielseitigkeit des Arzneistoffträgersystems wird es sogar in der Lebensmitteltechnologie als Carrier für bioaktive Nahrungsbestandteile verwendet [Weiss et al. 2008].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Lipidmatrices (LM) und Lipidnanosuspensionen (SLN)

Das vollkommen hydrierte Lecithin Phospholipon 90 H wurde von Phospholipid (D-Köln) zur Verfügung gestellt. P90H ist ein Sojalecithin, das - laut Herstellerangaben - mind. 90 % hydriertes Phosphatidylcholin (PC) und maximal 4 % hydriertes Lysophosphatidylcholin (LPC) enthält. Die Zusammensetzung der Fettsäuren des P90H entspricht mindestens 98 % an Stearin- und Palmitinsäure, welche eine Kettenlänge von C18 (Stearinsäure) und C16 (Palmitinsäure) aufweisen. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren im P90H liegt bei maximal 2 %.

Das Hartfett Softisan 154 (S154), ein Triglyceridgemisch, wurde von Condea (D-Witten) gestellt. Solutol HS 15 wurde von BASF (D-Ludwigshafen) geliefert. Hierbei handelt es sich um Macrogol-15-hydroxystearat, welches als Emulgator und Stabilisator der SLN eingesetzt wurde. Als Lecithin mittlerer Kettenlänge wurde Lipoid PC 14:0/14:0 (Dimyristoylphosphatidylcholin = DMPC) eingesetzt, welches von Phospholipid (D-Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Thiomersal als Konservierungsmittel, bovines Serumalbumin (BSA) und das Konjugat aus Fluoresceinisothiocyanat und bovinem Serumalbumin (FITC-BSA) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (D-Steinheim) bezogen. Halbsynthetisches humanes Insulin in lyophilisierter Form wurde von der Firma Aventis (D-Frankfurt a. Main) bereit gestellt. Als alternative Konservierungsmittel zu Thiomersal wurden Nipagin (Parahydroxybenzoesäuremethylester), Benzylalkohol, Cetylpyridiniumchlorid und Benzalkoniumchlorid (alle Firma Caelo, D-Hilden) sowie Nipasol (Parahydroxybenzoesäurepropylester) von der Firma Fluka (CH-Buchs) bezogen. Unkonservierte Nanosuspensionen wurden mit apathogenem Escherichia coli (E.coli) kontaminiert, welches vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt worden ist.

Für alle Untersuchungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die Chemikalien besaßen allesamt einen hohen analytischen Reinheitsgrad.

3.1.2 Analytik

Für Lösungsversuche von P90H wurden als Lösungsmittel Isopropylmyristat (IPM) und Mittelkettige Triglyceride (MKT) von Caelo (D-Hilden) verwendet. Für eine Prüfung auf Sterilität von Anaerobiern wurde ein Fleischpepton-Nähragar und für einen Steriltest auf Hefen und Pilze ein Malzextrakt-Agar verwendet (beide Merck, D-Darmstadt).

Als organische Phase bei ^{31}P -NMR-Messungen dienten Chloroform- d_1 mit einem Deuterierungsgrad von 99,8 % (Deutero GmbH, D-Kastellaun), Methanol (Fisher Scientific, UK-Loughborough) und eine Lösung aus Cäsiumcarbonat (Sigma-Aldrich, D-Steinheim) und Ethylendiamin-tetraessigsäure (Fluka, CH-Buchs) in Deuteriumoxid (Deuterierungsgrad 99,9 %; Deutero GmbH, D-Kastellaun). Als Kalibriersubstanz wurde Triphenylphosphat 99+% (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

Für massenspektroskopische Untersuchungen wurden Natriumsulfat, Dichlormethan (beide Merck, D-Darmstadt), Methanol (Fisher Scientific, UK-Loughborough) und Trimethylsulfoniumhydroxid (Macherey-Nagel, D-Düren) benötigt. Als Kalibriersubstanz diente Tetramethylsilan (Sigma-Aldrich).

Für die diskontinuierliche Elektrophorese wurden Sammel- und Trenngel, Puffer-, Färbe-, Fixier- und Entfärbelösungen hergestellt. Die Gele setzten sich neben Wasser aus Acrylamid, Bis-Acrylamid, Trometamol-HCl (Tris), Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), Ammoniumpersulfat (alle Sigma-Aldrich) und Saccharose (Caelo, D-Hilden) zusammen. Die Pufferlösungen enthielten Tris-Base, Glycin, HCl (alle Sigma-Aldrich), Harnstoff (Caelo) und Bromphenolblau (Merck). Für die Färbe-, Fixier- und Entfärbelösungen wurde Coomassie brilliant blue R 250 (Sigma-Aldrich), Methanol und Eisessig (Fluka) benötigt.

Auch für all diese Untersuchungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die Chemikalien besaßen allesamt einen hohen analytischen Reinheitsgrad.

3.2 Methoden

3.2.1 Lösungsversuche von P90H

Zur Untersuchung des Lösungsverhaltens von P90H in verschiedenen Lösungsmitteln wurde das Phospholipid in Konzentrationen von 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 und 10 % in MKT und IPM gegeben und bis zur klaren Lösung bei 40 °C gerührt. Des Weiteren wurden in die Zubereitungen mit 0,01; 0,1 und 0,5 % P90H bis zu 1 % (alle m/m) DMPC hinzu gegeben, welches als Lösungsvermittler dienen sollte.

3.2.2 Herstellung der Lipidmatrix (LM)

Die untersuchte LM bestand aus S154 und 0 bis 60 % (m/m) P90H. Die einzelnen Bestandteile wurden in eine Metallschale gegeben und auf dem Wasserbad bei über 80 °C aufgeschmolzen.

Die Rekristallisation erfolgte einerseits bei Raumtemperatur (RT) und andererseits während des Mörserns der Schmelze unter flüssigem Stickstoff. Nach beiden Varianten der Rekristallisation hergestellte LM wurden untersucht. Die Untersuchungen begannen einen Tag nach der Herstellung und endeten nach einem Jahr.

Für weitere Untersuchungen wurden LM aus S154 mit 10 und 20 % P90H bei einem Zusatz von 5, 10 bzw. 15 % DMPC hergestellt (alle m/m).

3.2.3 Herstellung der SLN

Die Standardformulierung der SLN enthielt 5 % LM, 1 % Solutol HS 15, 0,005 % Thiomersal und 94 % bidestilliertes Wasser (alle Einwaagen m/m). Die LM enthielten 0 bis 20 % P90H (alle m/m) neben S154, wobei LM zum Einsatz kamen, die aus der Schmelze bei Raumtemperatur kristallisiert worden waren. Alle Bestandteile wurden in verschließbare Gefäße eingewogen und bei 80 °C geschmolzen. Anschließend wurde eine heiße Präemulsion mit Hilfe eines Ultra Turrax (Ika, D-Staufen) bei 13000 U/Min. für 5 Minuten hergestellt. Die heiße Präemulsion wurde dann mit dem Hochdruckhomogenisator Emulsiflex-C5 (Avestin, CAN-Ottawa) bei 1000 bar und 50 °C in 20 Zyklen homogenisiert. Das Probenvolumen betrug 30 mL. Eine schmelzpunktnahe Hochdruckhomogenisation, wie von Friedrich 2005 praktiziert, konnte nicht durchgeführt werden, da der Homogenisator im Zuge dieser Herstellungsweise verstopfte. Alternativ zur Herstellung mit dem Emulsiflex-C5 wurden die heißen Präemulsionen mit dem Homogenisator APV-2000 (APV, D-

Unna) bei 60 °C und 1000 bar homogenisiert. Das Probenvolumen betrug bei diesem Homogenisator 100 mL. Die SLN wurden bei Raumtemperatur erstarren gelassen und einen Tag, eine Woche, einen Monat, 3 Monate und 6 Monate nach der Herstellung untersucht.

3.2.4 Variation der SLN-Herstellung

Abweichend von der in 3.2.3 genannten Standardformulierung wurden SLN mit 7,5 %, 10 % und 15 % LM-Anteil hergestellt. Der P90H-Anteil in der LM lag bei diesen untersuchten Systemen bei 10, 20 und 30 % (m/m).

Das Verhältnis der Massenanteile von der LM und Solutol lag bei diesen Systemen bei 5:1. Aus der folgenden Tabelle 3.1 ist die Rezepturzusammensetzung für die einzelnen Systeme mit unterschiedlichem LM- und P90H-Gehalt abzulesen.

Tabelle 3.1: Rezepturzusammensetzung der Bestandteile P90H, S154 und Solutol bei Variation der SLN-Herstellung mit 10, 20 und 30 % P90H in 7,5, 10 bzw. 15 % LM. Das LM-Solutol-Verhältnis beträgt 5:1.

	7,5 % LM	10 % LM	15 % LM
10 % P90H	0,75 % (m/m) P90H 6,75 % (m/m) S154 1,5 % (m/m) Solutol	1 % (m/m) P90H 9 % (m/m) S154 2 % (m/m) Solutol	1,5 % (m/m) P90H 13,5 % (m/m) S154 3 % (m/m) Solutol
20 % P90H	1,5 % (m/m) P90H 6 % (m/m) S154 1,5 % (m/m) Solutol	2 % (m/m) P90H 8 % (m/m) S154 2 % (m/m) Solutol	3 % (m/m) P90H 12 % (m/m) S154 3 % (m/m) Solutol
30 % P90H	2,25 % (m/m) P90H 5,25 % (m/m) S154 1,5 % (m/m) Solutol	3 % (m/m) P90H 7 % (m/m) S154 2 % (m/m) Solutol	4,5 % (m/m) P90H 10,5 % (m/m) S154 3 % (m/m) Solutol

Eine weitere Variation zur bereits genannten Standardrezeptur war eine konstante Solutol-Konzentration von 1 % in Systemen mit 7,5 und 15 % LM, die 10, 20 bzw. 30 % an P90H enthielten.

Die Zusammensetzung dieser Zubereitungen ist in Tabelle 3.3 aufgeführt. Die in 3.2.3 vorgestellten Standardformulierungen sind in dieser Tabelle grau hinterlegt.

Abweichend zur standardmäßig eingesetzten Anzahl von 20 Zyklen wurden für die Standardformulierungen 15 und 25 Durchläufe gewählt, um einen Einfluss der

Homogenisationsdauer auf die Partikelgrößen bzw. Phospholipid-Zusammensetzung der SLN zu untersuchen. Eine Probe, die 5 % LM mit anteiligen 20 % P90H enthielt und bei 25 Zyklen im Hochdruckhomogenisator hergestellt wurde, wurde als stichprobenartiger Prüfgegenstand einer gaschromatographischen Untersuchung mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) unterworfen, um die Fettsäurezusammensetzung nach maximaler Homogenisationsdauer zu überprüfen.

Alternativ zu den mit 0,005 % Thiomersal (m/m) konservierten Proben wurden sowohl unkonservierte als auch strahlensterilisierte SLN physiko-chemisch untersucht. Die Strahlensterilisation wurde mit einer Cäsiumquelle (Gammacell 2000/ Molsgaard Medical, DK-Heorsholm) an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) mit Gammastrahlung durchgeführt. Im Austausch zum Konservierungsmittel Thiomersal wurden Alternativen eingesetzt, die in der folgenden Tabelle 3.2 mit dem eingesetzten Konzentrationsbereich aufgeführt wurden.

Tabelle 3.2: Eingesetzte Konservierungsmittel in den Nanosuspensionen mit Konzentrationsangabe.

Konservierungsmittel	Eingesetzte Konzentration
Thiomersal	0,005 %
Nipagin	0,4 %
Nipasol	0,4 %
Nipagin/Nipasol (Nip/Nip) (1:1)	0,2 %
Nipagin/Nipasol/Benzylalkohol (Nip/Nip/BA)(1:1:5)	0,1 %
Benzylalkohol	0,5 %
Cetylpyridiniumchlorid	0,1 %
Benzalkoniumchlorid	0,25 %

3.2.5 Herstellung der halbfesten Systeme

Bei einem LM-Anteil von 15 % und 1 % Solutol bei 10, 20 und 30 % P90H in der Lipidmatrix und bei der Rezeptur mit 7,5 % LM bei einem Anteil von 10 % P90H erhielt man halbfeste Systeme. Diese Rezepturen sind in Tabelle 3.3 mit kursiver Schrift hervorgehoben.

Tabelle 3.3: Rezepturzusammensetzung der Bestandteile P90H, S154 und Solutol bei Variation der SLN-Herstellung mit 10, 20 und 30 % P90H in 5, 10 bzw. 15 % LM. Die Solutol-Konzentration beträgt stets 1 %.

	5 % LM	7,5 % LM	15 % LM
10 % P90H	0,5 % (m/m) P90H 4,5 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	0,75 % (m/m) P90H 6,7 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	1,5 % (m/m) P90H 13,5 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol
20 % P90H	1 % (m/m) P90H 4 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	1,5 % (m/m) P90H 6 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	3 % (m/m) P90H 12 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol
30 % P90H	1,5 % (m/m) P90H 3,5 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	2,25 % (m/m) P90H 5,25 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol	4,5 % (m/m) P90H 10,5 % (m/m) S154 1 % (m/m) Solutol

3.2.6 Partikelgrößenmessung

Der hydrodynamische Durchmesser (z-average) und der Polydispersitätsindex (PI) der SLN wurden per Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern, D-Herrenberg) bestimmt, der mit einem He/Ne-Laser (4 mW) ausgerüstet war. Die Proben wurden vor der Messung mit filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt, um Mehrfachstreuung zu vermeiden. Die Nanosuspensionen wurden in Polycarbonat-Küvetten (Sarstedt AG & Co., D-Nürnberg) bei 20 °C vermessen. Die Detektion des Streulichts erfolgte bei einem Winkel von 173° (NIBS = Non Invasive Backscatter Detection), der den Weg des Streulichtes durch die Probe verkürzt und somit das Risiko von Mehrfachstreuung reduziert.

Es wurden, wenn nicht anders angegeben, n=6 Proben vermessen und der Mittelwert mit Standardabweichung graphisch dargestellt.

3.2.7 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Thermoanalytische Untersuchungen der LM und der SLN wurden mit einem Differential Scanning Calorimeter DSC 220C mit Diskstation SSC 5200 (Seiko Instruments, JP-Tokio) aufgenommen. 4-10 mg der zu untersuchenden LM oder SLN wurden in Aluminiumtiegel (Seiko, JP-Tokio) kalt verschweißt und in einem Temperaturbereich von 20-110 °C mit einer Heizrate von 5 °C/Min gegen einen

entsprechenden Leertiegel vermessen. Zur Auswertung von Phasenumwandlungstemperaturen und -enthalpien stand die geräteeigene Software zur Verfügung.

3.2.7.1 Bestimmung des Kristallinitätsindex (CI)

Die Bestimmung des CI bei DSC-Untersuchungen erfolgte über die errechneten Enthalpien aus den Flächen der Schmelzpeaks nach Gl. 1:

$$\text{CI [\%]} = \frac{\text{Enthalpie LM} \cdot 100}{\text{Enthalpie S154 bulk}} \quad \text{Gl. 1}$$

Der CI ist ein Maß für die Kristallinität der LM.

3.2.8 TAM

Das für die TAM-Messungen verwendete Kalorimeter war ein 2277 Thermal Activity Monitor[®] (TAM, Thermometric AB, S-Jarfalla). Zwei Kalorimeter-Einheiten wurden installiert und liefen gleichzeitig. 2 g der Nanosuspension bzw. 300 mg der LM wurden in 3 mL-Glasampullen gewogen. Wärmeflusssignale wurden mit Digitam Software (Thermometric AB, S-Jarfalla) ausgewertet. Der Messbereich lag für alle Experimente zwischen -1000 and 1000 μW (elektrische Kalibration). Die Messtemperatur lag bei 20 °C. Vor den Messungen mussten die Ampullen für 30 Minuten äquilibriert werden. Aus diesem Grund konnte der Kristallisationsprozess nicht von Anfang an betrachtet werden, so dass die gesamte Kristallisationsenthalpie nicht zugänglich war.

Die TAM-Messungen wurden in Kooperation mit Burkhard Schicke durchgeführt.

3.2.9 Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD)

Die SAXD-Aufnahmen wurden mit einer Kiessig-Kamera (Institutseigenbau) durchgeführt. Die Röntgenstrahlung der Wellenlänge 0,1542 nm ($\text{Cu-K}\alpha$) wurde von einem Generator PW1730 (Philips, NL-Eindhoven) mit einer Röhre PW2213/20 (Panalytical, NL-Almelo) bei einer Stromstärke von 25 mA und 40 kV produziert. Die Strahlung wurde durch eine Nickelfolie gefiltert, um den Anteil an $\text{K}\beta$ -Strahlung zu verringern.

Die Proben mit einer Schichtdicke von 1 mm befanden sich in einem würfelförmigen Probenhalter (Institutseigenbau) zwischen zwei röntgenamorphen Kaptonfolien (Krempel, D-Kuppenheim). Die Messungen fanden im Vakuum bei Raumtemperatur statt. Zur Detektion wurde ein ortsempfindlicher Detektor (OED 50M) eingesetzt. Die

Datenübertragung zum Computer erfolgte mit einer ASA-SAX Karte (beide M.Braun, D-Garching).

Die Berechnung der Netzebenenabstände erfolgte mittels der Braggschen Gleichung (s. Gl. 2):

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad \text{Gl. 2}$$

Dabei stellt n die Ordnung der Interferenz, λ die Wellenlänge der eingesetzten Röntgenstrahlung, d den Netzebenenabstand und θ den Winkel dar, unter dem ein Interferenzmaximum auftritt.

3.2.10 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)

Die Untersuchung von Netzebenenabständen im Nahordnungsbereich erfolgte mit der Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD). Lecithin-Hartfett-Mischungen wurden in Aluminiumträger eingeschmolzen, wohingegen Nanosuspensionen in den Träger hinein pipettiert wurden. Die Messung erfolgte mit einem Röntgen-Goniometer PW3040/60, das mit einer Röhre PW3373/00 (Kupferanode) bestückt war. Der Generator wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 40 mA betrieben und lieferte Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0,1542$ nm. Die Messungen wurden bei $3-45^\circ$ ($0,0017^\circ/15$ sec) durchgeführt (alle Gerätebestandteile PANalytical, NL-Almelo). Netzebenenabstände aus den registrierten Interferenzen wurden mit Hilfe der Bragg Gleichung (Gl. 2) bestimmt.

Die Präemulsionen der SLN mit 0 bis 50 % P90H in der LM wurden nach Abdunstung der wässrigen Phase bei 40°C nach zuvoriger halbstündiger Konditionierung bei 50°C und 95 % rH in der Feuchtekammer (THC) der WAXD-Apparatur vermessen. Die Dauer der Messung betrug 15 Minuten.

Die THC mit der Temperierungseinrichtung stammte von Anton Paar GmbH (A-Graz), wobei ein Gasdruck- und Feuchtegenerator RH-200 (Edge Tech, GB-Marlborough) sowie ein Wasserbad NESLAB EX7 (Thermo Electron, USA-Newington) zum Einsatz kamen.

3.2.11 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben

Zur Replizierung wurden die Systeme zunächst zwischen zwei Goldträgern in schmelzendem Stickstoff von -210°C unter Erhalt ihrer kolloidchemischen Struktur

schockgefroren. Das Brechen der tiefgefrorenen Proben erfolgte anschließend im Rezipienten einer Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, D-Wiesbaden) bei $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ bar. Zur Herstellung eines Replikums wurden die Bruchflächen unter einem Winkel von 45° mit einer 2 nm dicken Platin-Kohle-Schicht bedampft. Die erhaltenen Replika wurden nach Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure und mit Wasser auf Kupfernetzen mit einem Transmissionselektronenmikroskop Leo 922 (D-Oberkochen) bei 100 kV untersucht.

3.2.12 Rheologische Untersuchungen der halbfesten Systeme

Rheologische Untersuchungen wurden an einem Rheometer Typ CVO 50 (Bohlin Instruments, D-Pforzheim) durchgeführt. Die Messgrößen wurden mit der geräteeigenen Software berechnet (Softwareversion 6.30, 1998). Als Messgeometrie diente die Kegel-Platte-Einrichtung CP 4/40 mit einem Kegelöffnungswinkel von 4° und einem Durchmesser von 40 mm. Der Messspalt betrug 150 μm . Alle Messungen erfolgten unter isothermen Bedingungen von $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und wurden jeweils doppelt durchgeführt.

3.2.13 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der SLN

Die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der unter erhöhter thermischer Belastung hergestellten Nanosuspensionen erfolgte mit einer Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS). Die Auftrennung der Proben wurde mit einem Gaschromatographen Finnigan TRACE GC (ThermoQuest, I-Mailand) durchgeführt. Mit dieser GC-Apparatur waren eine Elektronenstoß-Ionisationsquelle und das Massenspektrometer Finnigan TRACE MS (ThermoQuest, GB-Manchester) gekoppelt. Die Proben wurden über einen Autosampler A200S (CTC Analytics, CH-Zwingen) aufgegeben und mit der geräteeigenen Software ausgewertet.

Die Bestimmung wurde freundlicherweise vom Laboratorium Spectral Service (D-Köln) durchgeführt.

3.2.14 Bestimmung des PC- und LPC-Gehaltes der SLN

Der Gehalt an PC und LPC wurde per ^{31}P -Kernresonanzspektrometrie (NMR) bestimmt. Über einen automatischen Probengeber BRUKER B-ACS 120 erfolgte die Bestimmung mit einem NMR-Spektrometer Avance 300 MHz mit einer magnetischen Flussdichte von 7,05 Tesla (alle Bruker Optik GmbH, D-Ettlingen).

Zur Gehaltsbestimmung wurde ein interner Standard eingesetzt. Die integrierten Signale jedes Prüfgegenstandes und des internen Standards wurden verglichen. Die Messungen und Auswertungen wurden ebenfalls von Spectral Service (D-Köln) durchgeführt.

3.2.15 Proteinbeladung der SLN

SLN wurden mit unterschiedlichen Proteinen beladen. Zum Einen wurden BSA und FITC-gelabeltes BSA nach der Herstellung an die SLN adsorbiert und andererseits Humaninsulin vor der Hochdruckhomogenisation hinzugesetzt.

3.2.15.1 Proteinbeladungskapazität der SLN

Die SLN-Dispersionen wurden mit einer 0,5 mg/mL BSA-Lösung in einem Verhältnis von 5:1 (SLN:BSA) gemischt und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beladungskapazität der SLN mit dem Modellprotein (BSA) wurde auf indirekte Weise ermittelt, indem nach 120-minütiger Zentrifugation der Probe mit einem Vivaspin 20 Konzentrator (Vivascience, D-Hannover) in der Zentrifuge Beckman Coulter Allegra 64R (Beckman Coulter, USA-Palo Alto) (20 °C, 3000 U/Min) das Filtrat auf seinen BSA-Gehalt analysiert wurde. Als Blindwert wurde eine partikelfreie Proteinlösung verwendet. Die Quantifizierung des Proteins erfolgte mit dem UV-Spektrometer (Multiplattenreader) Power Wave XS (Bio-Tek Instruments GmbH, D-Bad Friedrichshall) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde die SLN-Standardformulierung mit FITC-BSA im Verhältnis LM zu Protein von 5:1 (m/m) beladen und über Nacht bei 20 °C inkubiert. Das gelabelte, fluoreszierende Protein wurde eingesetzt, um eine direkte Beladung von SLN mit Protein messtechnisch direkt erfassen zu können. Die FITC-BSA-Konzentration lag zwischen 0 und 80 µg/mL. Die Kalibrierung erfolgte einerseits mit FITC-BSA ohne SLN-Zusatz und andererseits mit Protein beladenen Nanopartikeln. Die fluorimetrische Bestimmung des FITC-BSA erfolgte mit dem Fluoreszenz-Spektralphotometer Mikrotiterplatten-Reader Genios (Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Die Proben wurden in 96er Wellplatten der Firma Nunc (D-Wiesbaden) gegeben. Mit Hilfe der Auswertungssoftware Magellan (Tecan Deutschland, D-Crailsheim) wurde die relative Fluoreszenzeinheit (RFU) der Standard- bzw. Probenlösungen bestimmt, die dann auf die jeweilige eingesetzte Proteinkonzentration bezogen wurde.

Des Weiteren wurden Emissionsspektren von FITC-BSA an einem Spektral-Fluorimeter F-4500 (Hitachi, JP-Tokio) bei Anregungswellenlängen von 484 und 486 nm durchgeführt.

3.2.15.2 SLN-Beladung mit Insulin

Das gefriergetrocknete Humaninsulin wurde zu 0,1; 0,2; 0,5; 1 und 3 % vor der Präemulgierung und der anschließenden Hochdruckhomogenisation zur Zubereitung gewogen und eingeschmolzen. Da sich Insulin erst bei einem pH < 5 löst, lag es nach der Hochdruckhomogenisation partikulär in der neutralen Nanosuspension vor. Die insulinbeladenen SLN wurden einer elektrophoretischen und circulardichrographischen Analyse unterworfen.

3.2.16 Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie

Die Fourier Transformation Infrarot Spektroskopie (FTIR) ist eine Methode, mit der Veränderungen in der Sekundärstruktur von Proteinen bestimmt werden können. Dies ist insofern von besonderem Interesse, da die Protein-Sekundärstruktur in situ im Originalsystem analysiert werden kann, weil sowohl Lösungen als auch Suspensionen, also gelöste und/ oder partikuläre Proteine neben weiteren Feststoffen untersucht werden können. SLN wurden nach der Herstellung mit dem Modellprotein BSA bzw. dem fluoreszenzmarkierten FITC-BSA beladen (2 mg/mL) und unverdünnt im Confocheck mit Hilfe einer Durchfluss-Transmissionszelle (AquaSpec, beide Bruker Optik GmbH, D-Ettlingen) einer Sekundärstrukturanalyse unterworfen. Es wurden 30 µL Probenvolumen pro Messung eingesetzt. Jeder Probenmessung schloss sich eine FTIR-Analyse des partikelhaltigen und proteinfreien Mediums als Referenz an. Die Auswertung erfolgte über eine Subtraktion der Protein-beladenen und proteinfreien Spektren mit Hilfe der geräteeigenen Software. Sämtliche Messungen wurden freundlicherweise von der Firma Bruker Optik (D-Ettlingen) durchgeführt.

3.2.17 Diskontinuierliche Elektrophorese

Zur Identitätsbestimmung von Insulin wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte mit dem Mini Vertical Gel System EC 120 (EC Apparatus Corporation, USA-Holbrook) und Consort E 834 (Consort NV, B-Turnhout) als Spannungsquelle. Die Polyacrylamidgele hatten eine Größe von 8,7 x 5,5 cm und eine Stärke von 0,75 mm. Als Trenngel wurde ein

8,5 %iges Polyacrylamidgel verwendet, während das Sammelgel 5 % Polyacrylamid beinhaltet (s. Tabelle 3.4). Nach Gießen von Trenn- und Sammelgel wurden die Proben mit maximal 10 µL je Probentasche aufgetragen.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die diskontinuierliche Elektrophorese.

	Sammelgel	Trenngel
Wasser	0,8 mL	0,3 mL
30 % Acrylamid/ Bis-Acrylamid (29:1)	0,4 mL	1,25 mL
0,15 M Tris-HCl (=Trometamol HCl)	-	1,25 mL
0,05 M Tris-HCl	0,75 mL	-
7 mM Ammoniumpersulfat	0,04 mL	0,5 mL
60 % Saccharose	1 mL	2 mL
Temed	-	0,004 mL
	pH 6,8	pH 9,1

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V im Sammelgel, bei 200 V im Trenngel und in beiden Gelen bei 100 mA und 20 W in ca. 70 Minuten. Als Laufpuffer fungierte ein Tris-Glycin-Puffer pH 8,3 (s. Tabelle 3.5). Die Proben wurden in Tris-Reagenz aufgenommen (s. Tabelle 3.6).

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des Laufpuffers der Elektrophorese.

	Tris-Glycin-Pufferlösung R pH 8,3
Tris (Base)	6,0 g
Glycin	28,8 g
Wasser	ad 1000 mL

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Probenpuffers der Elektrophorese.

	Tris-Reagenz R
Tris	1,5 g
HCl (1 mol/L)	12 mL
Harnstoff	96 g
Bromphenolblaulösung (0,2 mg/mL)	20 µL
Wasser	ad 200 mL

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte direkt in den Gelen durch Coomassie-Blau-Färbung. Dazu wurden die Gele etwa eine Stunde mit der Färbelösung behandelt. Anschließend wurde für ca. 30 Minuten mit Entfärber I und für weitere 60 Minuten mit Entfärber II entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren (s. Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Färbe-, Fixier- und Entfärbungslösung der Elektrophorese.

	Färbe- und Fixierlsg.	Entfärber I	Entfärber II
Coomassie brill. blue R 250	125 mg	-	-
Methanol	50 mL	50 mL	5 mL
Eisessig	10 mL	10 mL	7 mL
Wasser	ad 100 mL	ad 100 mL	ad 100 mL

In Abb. 3.1 ist ein schematischer Aufbau der diskontinuierlichen Elektrophorese abgebildet.

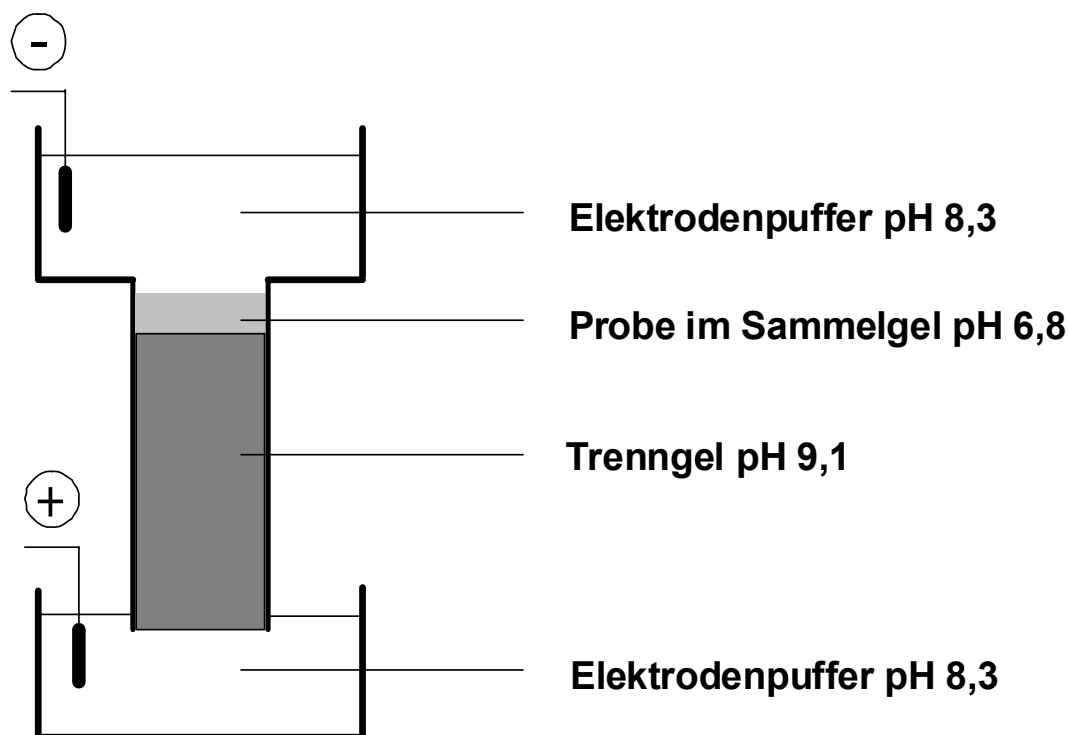


Abb. 3.1 Schematischer Aufbau der diskontinuierlichen Elektrophorese.

3.2.18 Circular dichroismus (CD)

Die Veränderung der Sekundärstruktur von Insulin wurde mit einem Spektralpolarimeter J715 (JASCO, D-Groß-Umstadt) untersucht. Die Insulin-Proben wurden mit Salzsäure (Sigma-Aldrich) auf pH 4,5 und somit in Lösung gebracht. Die Insulin-Konzentration in den Proben betrug 0,01 %. Die CD-Spektren wurden bei Raumtemperatur zwischen 180 und 260 nm in einer optischen Spezial-Quarzglasküvette QX Suprasil 300 (Hellma, D-Mülheim/Baden) mit 1 mm Schichtdicke gemessen. Jedes erhaltene Spektrum berechnete sich aus 6 wiederholten Scans, korrigiert durch Subtraktion des Blindwertes (unhomogenisierte Insulin-Lösung 0,01 %). Der Helixanteil wurde mit Hilfe der Auswertungssoftware Secondary Structure Estimation der Firma JASCO berechnet.

3.2.19 Prüfung auf Sterilität

Eine Prüfung auf Sterilität auf Anaerobier und Hefen und Pilze wurde mit unkonservierten Nanosuspensionen durchgeführt. Der Nähragar wurde jeweils 15 - 20 Minuten aufgekocht, bis eine klare Lösung entstanden war. Anschließend wurden 15 mL dieser Agarlösung in Reagenzgläser gegossen und bei 121 °C für 15 Minuten bei 2 bar autoklaviert. Nach der Sterilisation des Agars wurde 1 mL der zu überprüfenden Nanosuspension in eine Petrischale vorgelegt und mit der autoklavierten und auf 30 °C abgekühlten Agarlösung versetzt. Die Petrischalen wurden für 8 Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert und bebrütet. Anschließend erfolgte eine Bewertung der Sterilität der Nanosuspensionen über eine Keimzahlbestimmung.

3.2.20 Mikrowellenbestrahlung zur Entkeimung von SLN

Für die Sterilisation in der Mikrowelle (Typ HF 0606, Siemens, D-München) wurden unkonservierte SLN-Proben (10 % P90H in der LM) mit E. coli beimpft (75 KBE/mL). 4 mL der beimpften Nanosuspension wurden in der Mikrowelle bei 90 bzw. 180 Watt für bis zu 2 Minuten behandelt (s. Tabelle 3.8). Es wurden folgende Bedingungen gewählt:

Tabelle 3.8: Mikrowellenversuchsbedingungen (Wattzahl und Einwirkdauer) für die Entkeimung von mit E.coli kontaminierten SLN-Proben.

Leistung	Einwirkdauer
90 Watt	30 sec, 60 sec, 90 sec, 120 sec
180 Watt	15 sec, 30 sec, 45 sec

Der Steriltest wurde für die in der Mikrowelle behandelten, unkonservierten SLN durchgeführt. Dafür wurde 1 mL der jeweiligen Probe auf Petrischalen, die einen keimspezifischen Nähragar (Fleischpepton-Nähragar für Anaerobier, Merck, D-Darmstadt) enthielten, aufgetragen. Diese wurden 8 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend anhand der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ausgezählt (s.a. Abschnitt 3.2.19). Beurteilt wurden die Proben in Hinblick auf Wattzahl und Behandlungszeit im Vergleich zu einer unbehandelten, beimpften und unkonservierten Probe, die ebenfalls im Brutschrank bei 30 °C für 8 Tage inkubiert wurde.

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen der LM

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden LM aus S154 und P90H auf zwei unterschiedliche Weisen hergestellt. LM rekristallisierten nach dem Aufschmelzen einerseits bei Raumtemperatur (Reihe 1) und andererseits unter Mörserung mit flüssigem Stickstoff (Reihe 2). Die physiko-chemische Charakterisierung erfolgte für beide Reihen gleichermaßen u. a. thermoanalytisch und röntgendiffraktometrisch.

4.1.1 Herstellung der LM

Die Herstellung der LM zeigte, dass eine Einarbeitung von mehr als 40 % Phospholipid ins geschmolzene Hartfett problematisch war und nur unter sehr hohen Temperaturen (Metallschale in Wasserbad) erfolgen konnte. Makroskopisch war ein inhomogenes Aussehen der LM zu beobachten, was darauf hindeutete, dass unterschiedliche Kristalle entstanden sein könnten.

Die folgende TEM-Aufnahme der LM sollte Aufschluss über den mikrostrukturellen Aufbau der LM geben (s. Abb. 4.1).

4.1.2 TEM-Aufnahme der LM

Bei den TEM-Aufnahmen der LM konnte zwischen Reihe 1 (Abkühlung bei RT) und Reihe 2 (Mörserung mit flüssigem Stickstoff) kein Unterschied festgestellt werden. Typisch waren Schichtstrukturen, wie sie für rekristallisiertes Hartfett charakteristisch sind (s. Pfeil in Abb. 4.1). Als Beispiel ist in Abb. 4.1 eine LM mit 30 % P90H dargestellt, die bei RT rekristallisiert ist (Reihe 1).

Ob Unterschiede im Schmelzverhalten der kristallinen Matrices auftraten, sollte in DSC-Untersuchungen überprüft werden.

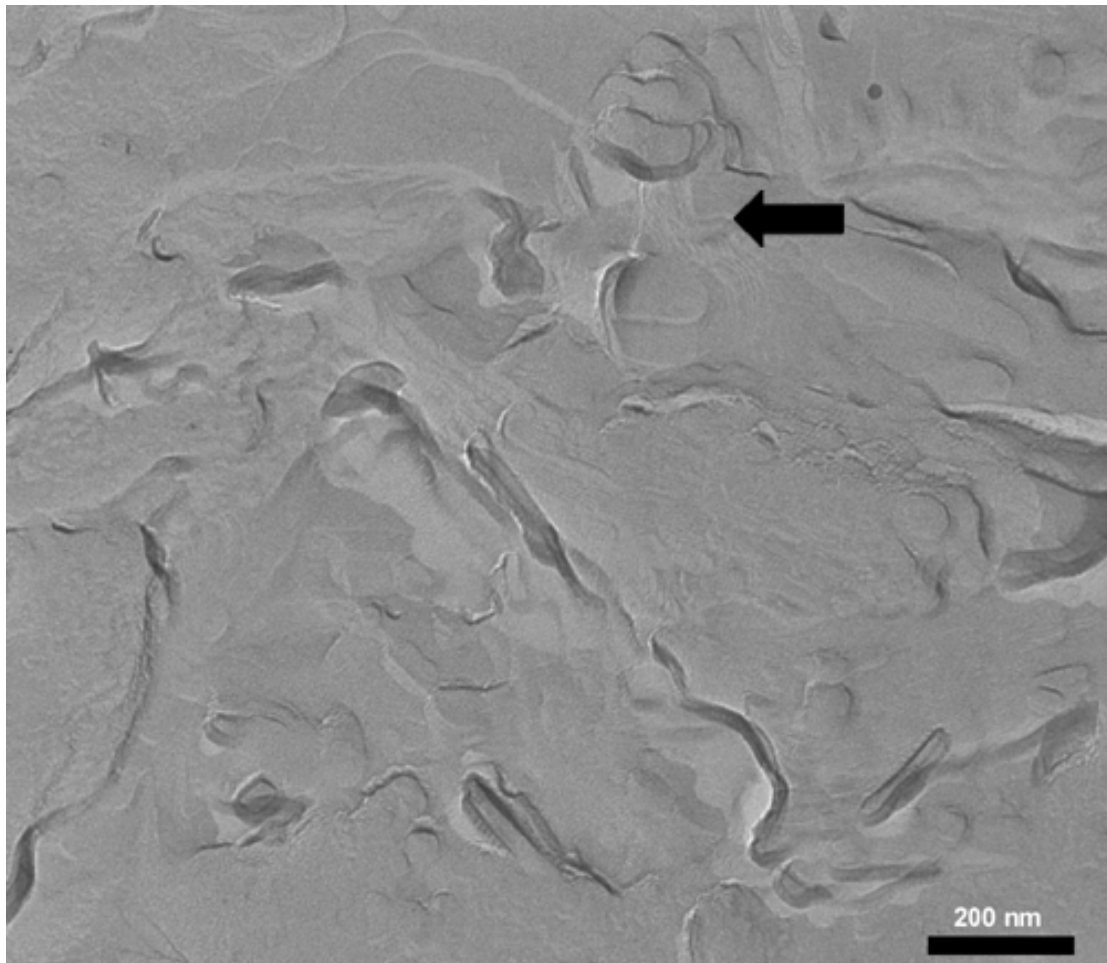


Abb. 4.1: TEM-Aufnahme einer LM mit 30 % P90H im Hartfett einen Tag nach der Herstellung (bei RT rekristallisiert).

4.1.3 DSC-Untersuchungen

LM, die nach beiden Varianten rekristallisiert worden waren, zeigten einen Tag nach Herstellung bzw. Auskristallisation eine charakteristische Schulter bei ca. 47 °C vor dem Schmelzpeak des Hartfetts (Übergangstemperatur bei ca. 57 °C). Diese Schulter konnte einer instabilen α -Modifikation zugeordnet werden [Hagemann 1988] und wandelte sich über einen Lagerzeitraum von drei Monaten in eine stabile β -Modifikation um, was sich durch das Verschwinden des Überganges bei 47 °C bemerkbar machte (s. Abb. 4.2). Der Übergang bei ca. 82 °C ist dem Phospholipid zuzuordnen. Mit steigendem Phospholipon-Gehalt in der LM nahm die Fläche dieses Peaks zu, zeigte aber sonst keine Besonderheiten.

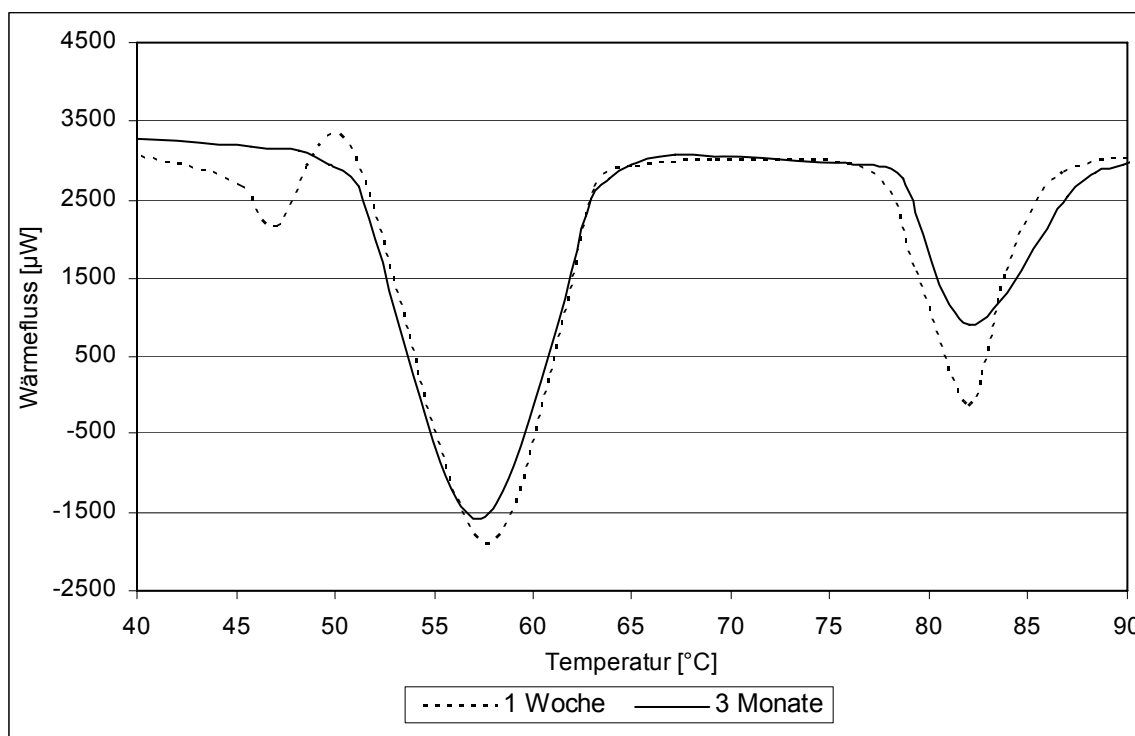


Abb. 4.2: DSC-Thermogramm einer LM mit 50 % P90H im Hartfettanteil. Rekristallisation erfolgte bei RT.

Im nächsten Schritt wurden DSC-Auswertungen der unterschiedlich rekristallisierten Proben durchgeführt, wobei die Schmelzübergangstemperaturen (s. Abb. 4.2: Peakminima) gegen den P90H-Gehalt aufgetragen wurden. Da sich zwischen den untersuchten Reihen 1 und 2 keine nennenswerten Unterschiede ergaben, sind in den folgenden Abb. 4.3 und Abb. 4.4 LM dargestellt, die bei RT erstarrt sind (Reihe 1).

Schon einen Tag nach der Herstellung konnte ein Schmelzübergang bei ca. 58 °C bei allen LM, die einen ansteigenden Anteil von 10-60 % P90H enthielten, detektiert werden. Dieser Schmelzübergang ist dem von Hartfett zuzuordnen, das als Bulkmaterial einen Schmelzpunkt von 57 °C aufweist. Ein zweiter Schmelzübergang wurde mit steigender P90H-Konzentration in der LM zwischen 80 und 100 °C detektiert, wie in Abb. 4.3 dargestellt ist. Der Schmelzübergang von reinem P90H liegt bei 90 °C. Diese Ergebnisse deuten auf eine Ausschleusung des P90H aus der LM hin. Auffällig ist jedoch eine annähernd lineare Erhöhung der Schmelztemperaturen zwischen 10 % und 60 % P90H-Gehalt in der Lipidmatrix.

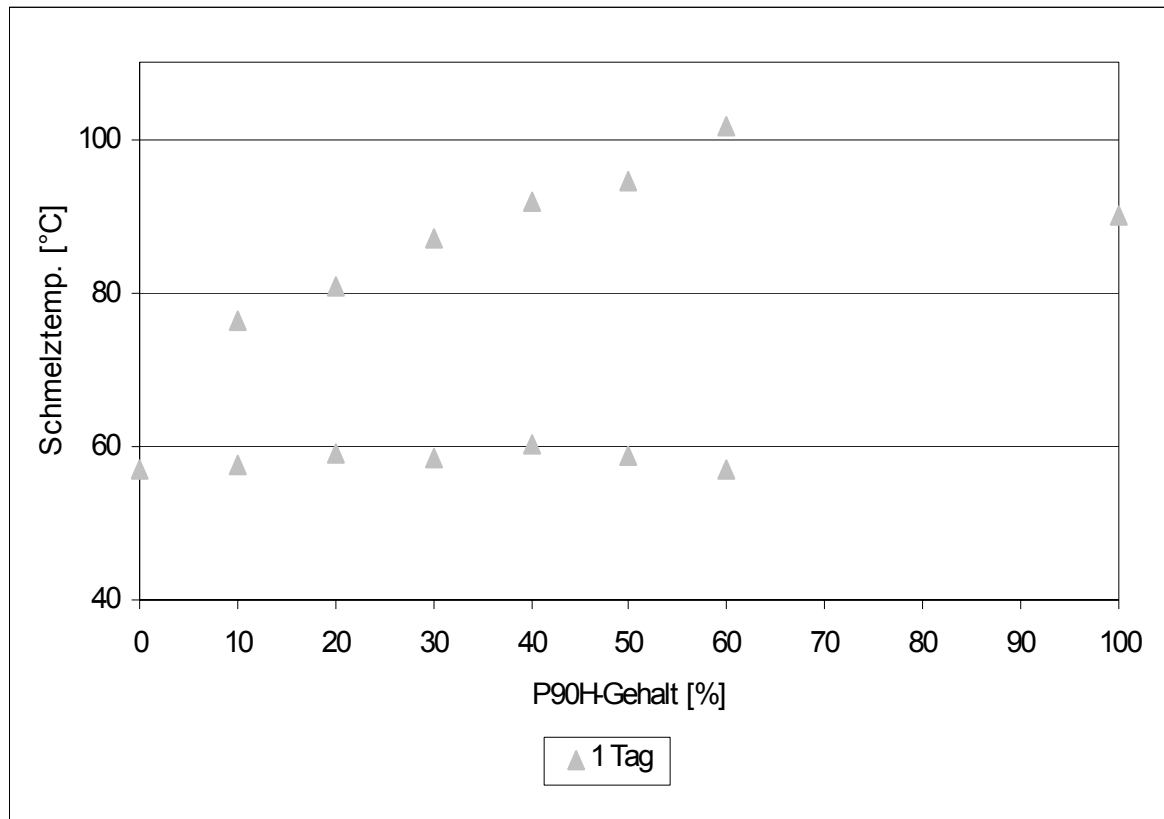


Abb. 4.3: Vergleich der Schmelzübergänge von LM aus S154 mit 10-60 % P90H (Reihe 1) einen Tag nach der Herstellung.

Über eine Lagerzeit von 3 Monaten bis hin zu einem Jahr veränderten sich die Werte beider Schmelzübergänge für alle LM. Der Übergang im tieferen Temperaturbereich blieb nah am Schmelzpunkt des reinen Hartfetts, wohingegen sich der Schmelzübergang bei höheren Temperaturen ca. 10 °C unter den Schmelzpunkt des reinen P90H-Bulk verlagerte und zwar konstant für alle Mischungen auf Werte um 80 °C.

Als mögliche Erklärung kommt in Betracht, dass sowohl das S154 als auch das P90H in irgendeiner Art und Weise interagieren. Möglicherweise findet eine Mischkristallbildung statt. Diese Hypothese sollte mit weiteren Untersuchungen belegt werden.

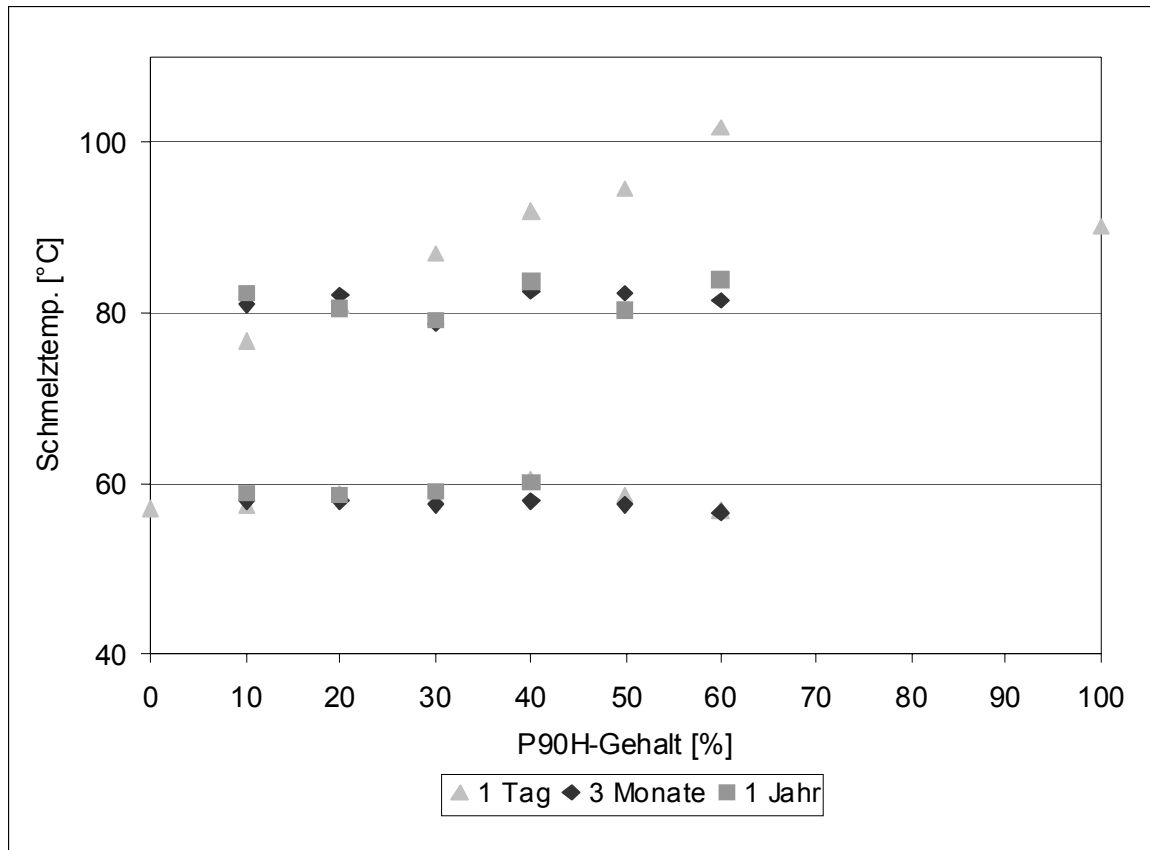


Abb. 4.4: Vergleich der Schmelzübergänge von LM aus S154 mit 10-60 % P90H (Reihe 1) einen Tag, drei Monate und ein Jahr nach der Herstellung.

4.1.4 Bestimmung des Kristallinitätsindex (CI)

Aus den Umwandlungsenthalpien nach einem Tag bzw. 3 Monaten Lagerung wurden Kristallinitätsindices (CI) berechnet (s. Abschnitt 3.2.7.1). Abb. 4.5 stellt die Veränderung der CI mit steigendem Phospholipid-Gehalt der Lipidmatrix dar. Die schwarze Gerade zeigt den theoretischen Abfall ausgehend von einem CI von 100 % bei reinem S154 in unbehandelter Bulk-Qualität. Vorbehandeltes Hartfett, d.h. aufgeschmolzenes und rekristallisiertes S154, wies eine Kristallinität von ca. 90 % auf. Mit Abnahme des Hartfettanteils ließ sich aus dem Schnittpunkt der Messgeraden mit der Abszisse der Wert von 85,7 % ablesen. Daraus kann abgeleitet werden, dass ca. 15 % an S154 nicht kristallisiert sind, sondern wahrscheinlich als feste Lösung vorliegen. Betrachtet man die ohnehin schon vorhandene Abnahme der Kristallinität von aufgeschmolzenem und rekristallisiertem S154-Bulk um ca. 10 % (s. Abb. 4.5), muss man einschränken, dass der insgesamt nicht-kristalline Anteil in der LM anstatt 14,3 % nur 4,3 % beträgt.

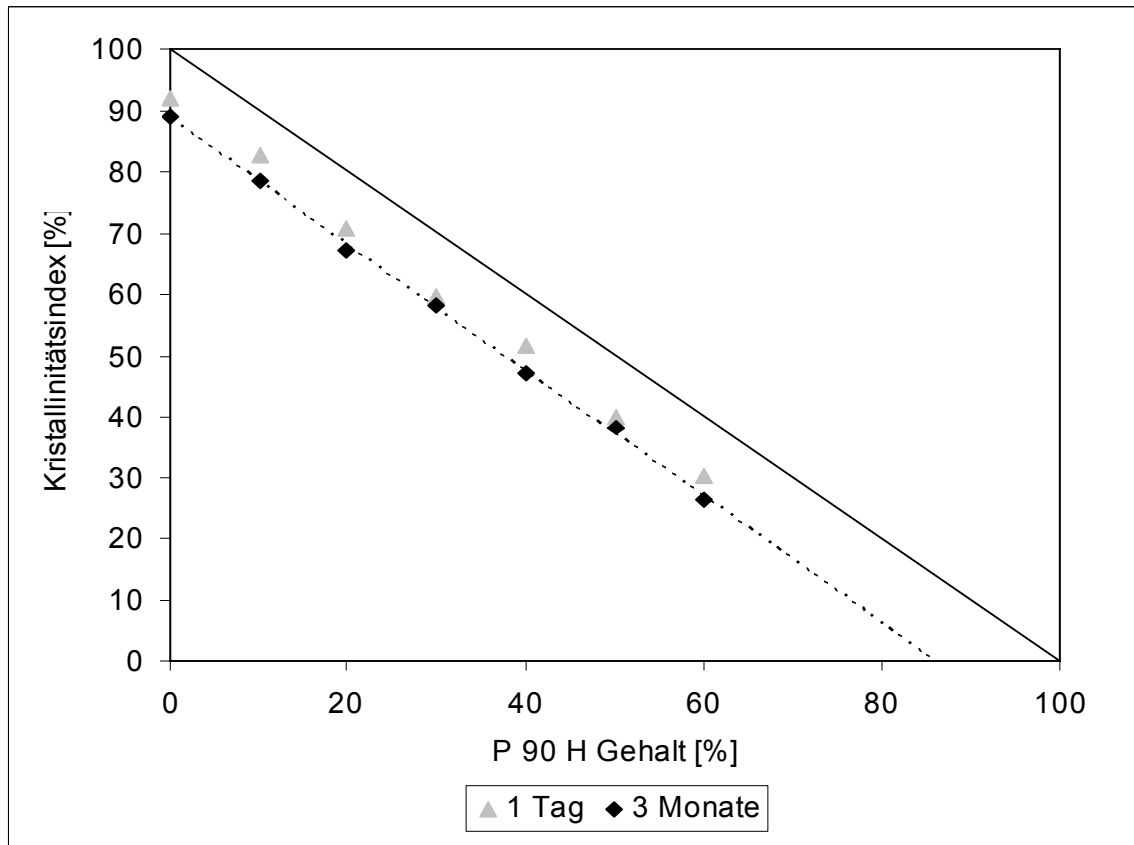


Abb. 4.5: Kristallinitätsindex der LM (Reihe 1) mit einem P90H-Gehalt von 0-60 %. Lagerzeitraum 3 Monate.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem steigenden P90H-Gehalt in der LM und dem Sinken der Kristallinität. Ein ähnlicher Geradenverlauf ergab sich bei der Untersuchung der Reihe 2 (s. Abb. 4.6). Über den Lagerzeitraum von 3 Monaten konnten zwischen den CI der LM keine Unterschiede festgestellt werden. Der Schnittpunkt der Messgerade mit der x-Achse ergab einen Wert von 84,5 %. Da auch aufgeschmolzenes und rekristallisiertes S154 einen Kristallinitätsverlust von ca. 10 % aufweist, liegen in den LM von Reihe 2 in der Differenz (15,5 %-10 %) in etwa 5,5 % als feste Lösung vor (s. Abb. 4.6).

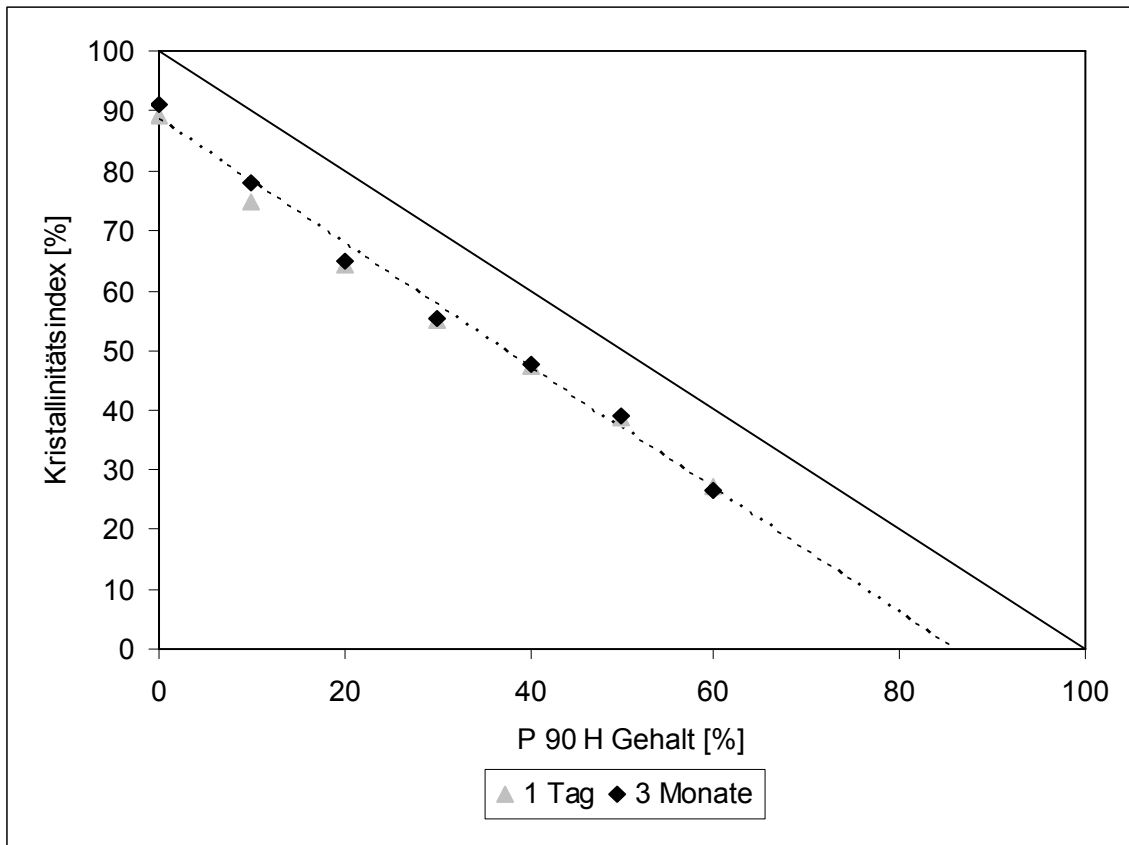


Abb. 4.6: Kristallinitätsindex der LM (Reihe 2) mit einem Lecithin-Gehalt von 0-60 %. Lagerzeitraum 3 Monate.

Anlehnend an die DSC-Untersuchungen wurden die Proben während der Rekristallisation bei Raumtemperatur isotherm mit dem Thermal Activity Monitor (TAM) auf Änderungen im Wärmefluss untersucht.

4.1.5 TAM-Untersuchungen

Wie in Abb. 4.7 dargestellt kam es im TAM über einen Messzeitraum von 12 Stunden zu einer kontinuierlichen Abnahme des Wärmeflusses mit der Zeit. Es waren mit fortschreitender Kristallisation keine Auffälligkeiten oder Veränderungen erkennbar. Es gab keinen Hinweis beispielsweise auf eine Modifikationsänderung.

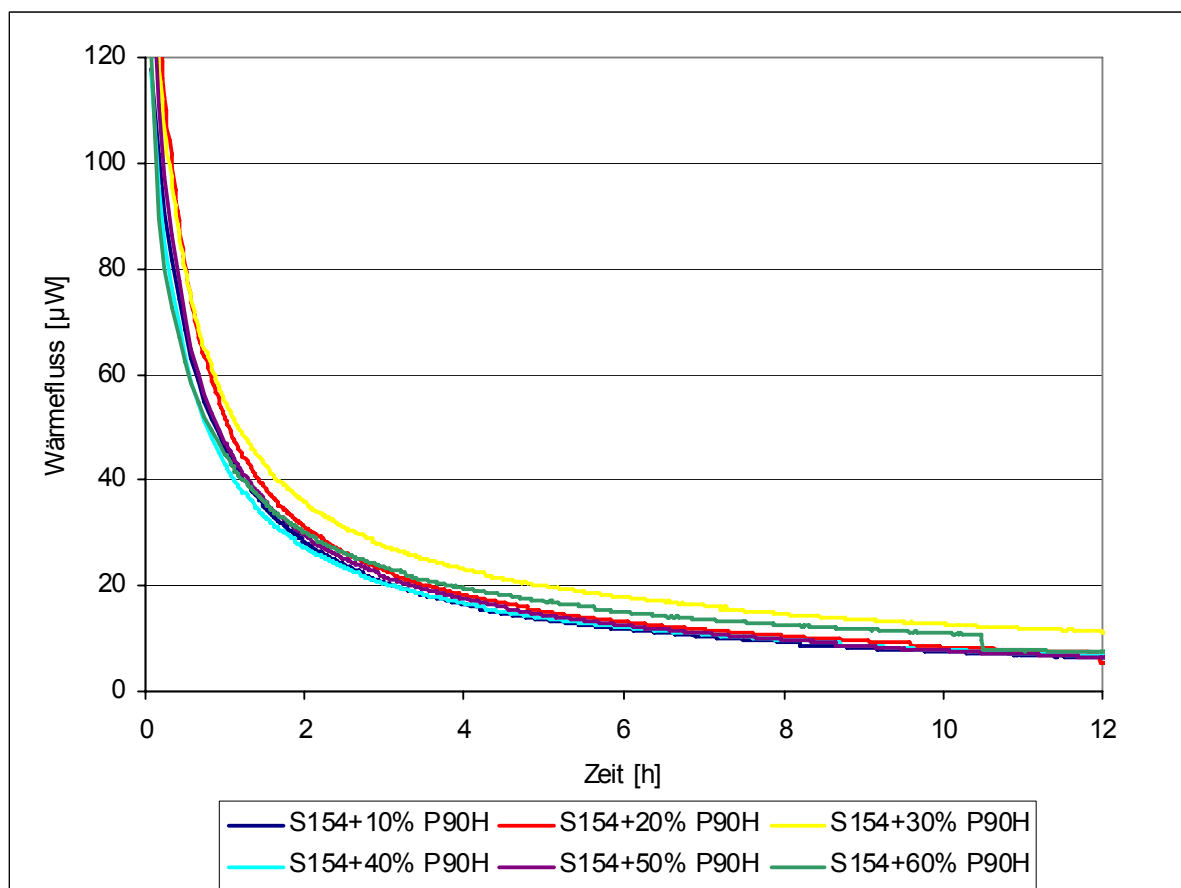


Abb. 4.7: Thermogramme von LM mit 10-60 % P90H über einen Zeitraum von 12 Stunden, Beginn der Messung nach 30 Minuten Äquilibrationszeit direkt nach der Herstellung.

Um den rekristallisierten LM die jeweils vorliegenden Modifikationen zuweisen zu können, wurden an die TAM-Untersuchungen WAXD-Messungen angeschlossen.

4.1.6 WAXD-Untersuchungen

Mit Hilfe von WAXD sind die Netzebenenabstände im Bereich der Nahordnung zugänglich. Über einen Lagerzeitraum von 3 Monaten kam es zu einer Umwandlung der instabilen α -Modifikation in eine β -Modifikation (s. Abb. 4.8). Damit konnten die DSC-Daten verifiziert werden.

Die WAXD-Kurven einen Tag, eine Woche, einen Monat und drei Monate nach Herstellung wurden übereinander gelegt und miteinander verglichen. Ein typisches Merkmal für eine β -Modifikation ist die Ausbildung einer weiteren Schulter bei ca. $19,5^\circ$ 2θ des Hauptpeaks, der bei ca. 21° 2θ liegt. Kurz nach der Herstellung konnte man die Ausbildung dreier Interferenzen noch nicht beobachten, jedoch bildete sich über die Lagerzeit die β -Modifikation aus. Unterschiede zwischen Reihe 1 und Reihe 2 konnten nicht festgestellt werden (Reihe 1 nicht abgebildet).

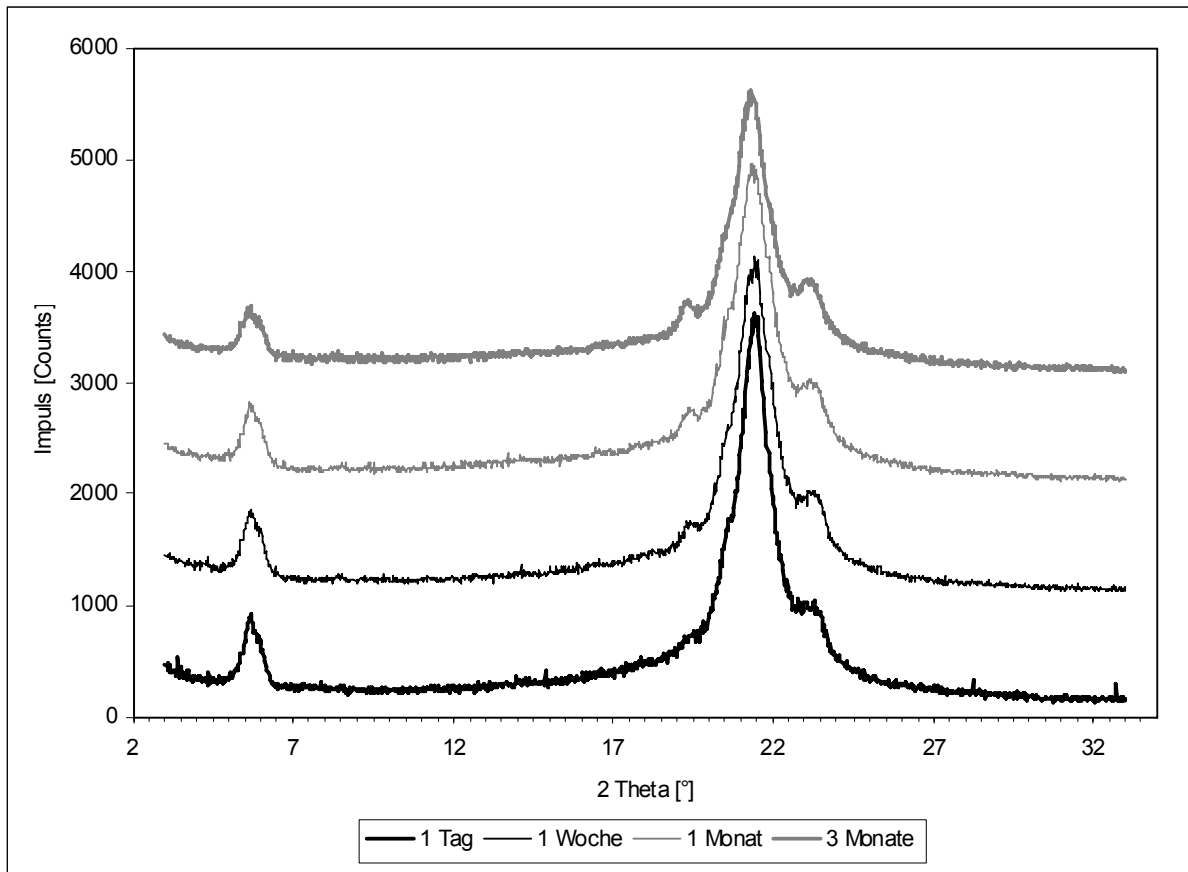


Abb. 4.8: WAXD von einer LM mit 50 % P90H (Reihe 2) über einen Lagerzeitraum von 3 Monaten.

Im Anschluss an die WAXD-Messungen wurden SAXD-Untersuchungen angeschlossen, die eine Aussage über den Einbau von P90H ins Kristallgitter des S154 machen sollten.

4.1.7 SAXD-Untersuchungen

Mit Hilfe von SAXD werden Netzebenenabstände im Bereich der Fernordnung erfasst. In Abb. 4.9 zeigten sich Unterschiede in den Interferenzen zwischen Reihe 1 und 2. Diffraktogramme von LM aus Reihe 1 besaßen eine einzige Interferenz mit Ausnahme der LM mit 30 und 40 % P90H, die zwei Interferenzen aufwiesen. Bei den untersuchten LM der Reihe 2 ergaben sich stets zwei Interferenzen. In diesem Fall ließen sich Netzebenenabstände im Bereich von ca. 4,5 nm und 6,5 nm berechnen. Die Ausbildung zweier Interferenzen deutete darauf hin, dass eine Auskristallisation des P90H neben dem Hartfett erfolgt ist. Bei den LM der Reihe 1 konnte P90H offensichtlich quantitativ in das Kristallgitter des Hartfetts eingebaut werden, was im Einklang mit der einzigen Interferenz steht.

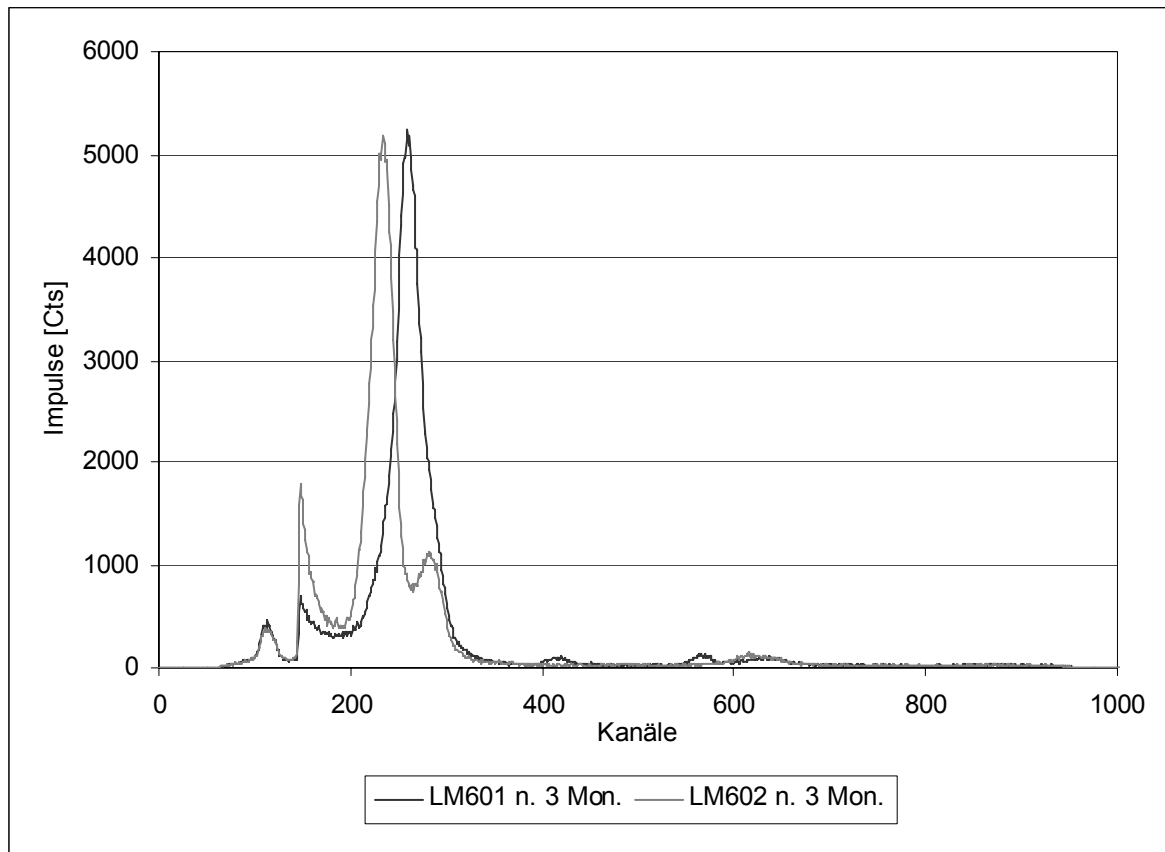


Abb. 4.9: SAXD-Diffraktogramme zweier LM mit jeweils 60 % P90H 3 Monate nach der Herstellung (LM601=Reihe 1, LM602=Reihe 2).

Die beiden Diagramme aus Abb. 4.10 und Abb. 4.11 stellen die Netzebenenabstände, berechnet aus den Diffraktogrammen der Reihe 2 (Abb. 4.10) und Reihe 1 (Abb. 4.11), dar. Im Vergleich zum Netzebenenabstand von reinem S154 (4,4 nm) war einen Tag nach der Herstellung und Stickstoffbehandlung (Reihe 2) eine Aufweitung des Kristallgitters nach Einbau von P90H um ca. 0,2 nm nachzuweisen. Diese Aufweitung reduzierte sich zwar über den Lagerzeitraum von 3 Monaten kontinuierlich, war aber dennoch bei 10 und 20 % P90H in der LM noch vorhanden (Ergebnisse nach einem Monat und zwei Monaten Lagerzeit nicht aufgeführt). Bei den mit Stickstoff behandelten Proben waren sowohl nach einem Tag als auch nach 3 Monaten Lagerzeit Interferenzen oberhalb von 6 nm und somit oberhalb der Interferenz von reinem P90H detektierbar. Diese Aufweitungen der Netzebenenabstände von S154 um ca. 0,2 nm und von P90H um fast 0,5 nm sind auf eine gegenseitige Interaktion der beiden Bestandteile zurückzuführen. Eine gemeinsame Verarbeitung von P90H und S154 führt zwar zu einer getrennten Kristallisation von Phospholipid und Hartfett, jedoch deuten die Aufweitungen auf

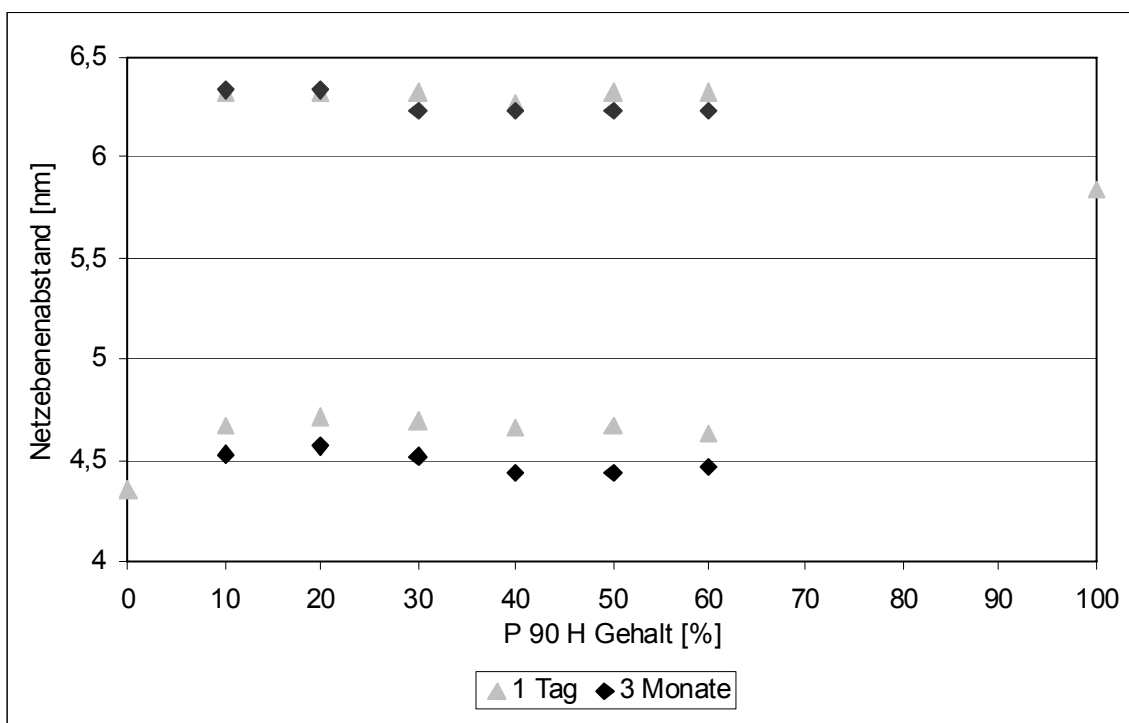


Abb. 4.10: Netzebenenabstände der LM (Reihe 2) einen Tag bzw. 3 Monate nach der Herstellung im Vergleich.

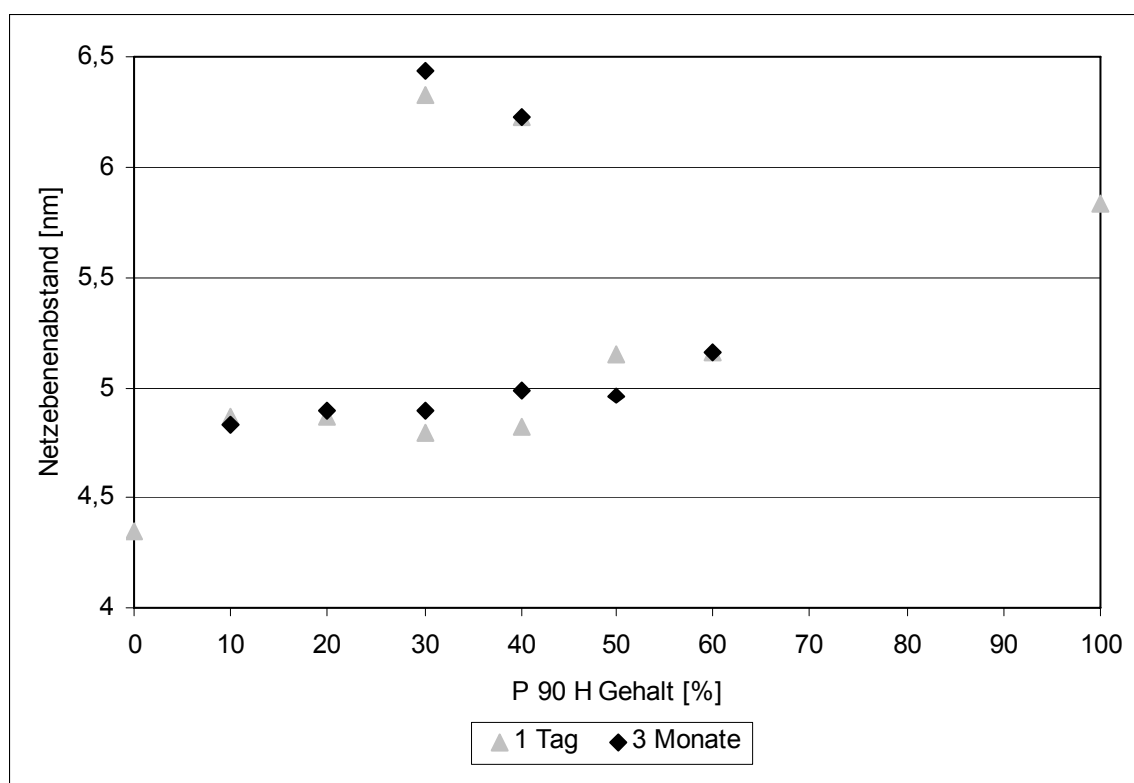


Abb. 4.11: Netzebenenabstände der LM (Reihe 1) einen Tag bzw. 3 Monate nach der Herstellung im Vergleich.

einen partiellen Einbau der jeweiligen zweiten Komponente in das Kristallgitter der ersten hin. Im Gegensatz zu den Untersuchungen aus Reihe 2 ließ sich eine geordnete Struktur des P90H bei Reihe 1 nur bei P90H-Konzentrationen von 30 und 40 % P90H beobachten (Abb. 4.11). Nur bei diesen LM war eine Aufweitung der Netzebenen erkennbar. Bei den für Hartfett charakteristischen Netzebenenabständen konnte einen Tag nach der Herstellung eine Veränderung von 4,4 nm (reines S154) auf ca. 4,8 nm in allen binären Mischungen mit 10 bis 40 % P90H in der LM bestimmt werden. Nur bei LM mit 50 und 60 % P90H in der LM veränderten sich die Netzebenenabstände in diesem Bereich von 4,4 nm auf ca. 5,1 nm. Die Netzebenenabstände der binären S154-P90H-Mischungen lagen 0,4 nm (10-40 % P90H in der LM) bzw. 0,7 nm (50 und 60 % P90H in der LM) oberhalb des Netzebenenabstandes von reinem S154, aber auch um ca. 1 bzw. 0,7 nm unterhalb des Netzebenenabstandes von reinem P90H. Dieses Ergebnis deutet auf eine Aufweitung des S154-Kristallgitters hin, was auf einen Einbau des P90H zurückzuführen ist. Diese Daten decken sich zum Teil mit den Ergebnissen nach drei Monaten und sind daher in Abb. 4.11 von diesen Datenpunkten verdeckt. Im Bereich von 30-50 % P90H in der LM weichen die Netzebenenabstände nach 3 Monaten Lagerzeit um ca. 0,2 nm von denen nach einem Tag ab. Die Zubereitung mit 50 % P90H in der LM zeigte eine Verringerung der Netzebenenabstände nach 3 Monaten Lagerzeit, wohingegen in den 30 und 40 % P90H-haltigen LM eine Erhöhung der Netzebenenabstände beobachtet werden konnte.

Mit weiterer Lagerzeit konnte sich bei den Untersuchungen der bei RT abgekühlten LM (Reihe 1) im Bereich von 6 nm eine weitere Interferenz herausbilden, die sogar oberhalb des Netzebenenabstandes von reinem P90H liegt (s. Abb. 4.12). Eine teilweise Ausschleusung des P90H aus dem S154-Kristallgitter kann zwar nicht ausgeschlossen werden, und findet über die Lagerzeit hinweg sogar vermehrt statt, doch ist aus der Aufweitung dieser Interferenz gegenüber der von reinem P90H darauf zu schließen, dass auch Triglyceride in das Gitter des Phospholipids eingebaut werden. Besonders auffällig war eine lineare Abhängigkeit der Aufweitung des S154-Kristallgitters von 4,4 nm bei reinem S154 bis 5,2 nm bei der binären Mischung mit 60 % P90H, welche in der folgenden Abb. 4.13 in einer Bestgerade gezeigt wird. Diese Darstellung deutet eindeutig auf eine Mischkristallbildung zwischen S154 und P90H mit einem damit verbundenen Einbau von P90H in das S154-Kristallgitter hin.

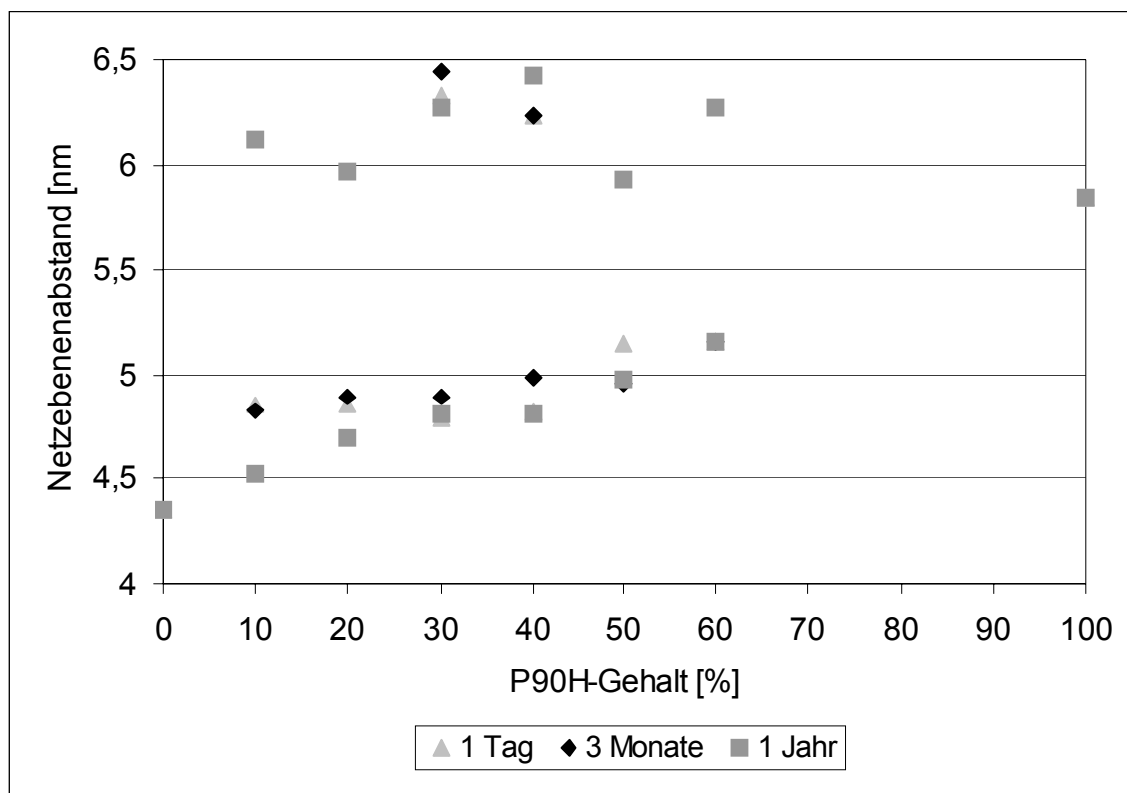


Abb. 4.12: Netzebenenabstände der LM (Reihe 1) einen Tag, 3 Monate bzw. 1 Jahr nach der Herstellung im Vergleich.

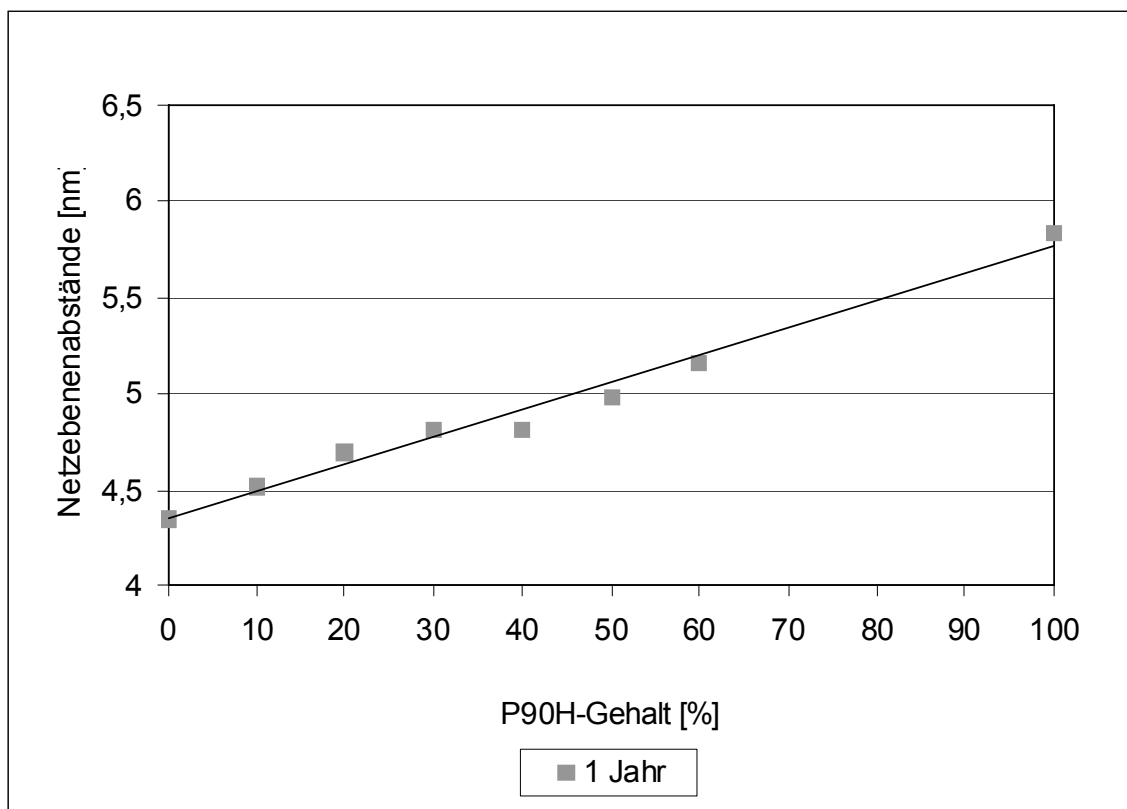


Abb. 4.13: Lineare Abhängigkeit des Netzebenenabstandes zum P90H-Anteil (10-60 %) in S154-LM (Reihe 1).

Die für Hartfett charakteristischen Netzebenenabstände wiesen in der LM, die bei RT rekristallisierte, über die Lagerzeit von drei Monaten eine Aufweitung von ca. 0,5 nm auf, welche sich sogar nach einem Jahr auf ca. 0,9 nm bei der 60 % P90H-haltigen LM steigerte. Die Abkühlung der Lipidmischungen bei RT hatte somit einen verbesserten Einbau des P90H in das Hartfett im Zuge einer konstanten Aufweitung der Netzebenenabstände zur Folge. Dies könnte als Mischkristallbildung interpretiert werden. Eine Rekristallisation der LM unter dem Einfluss von flüssigem Stickstoff (Reihe 2) zeigte diese Ergebnisse nicht. Für die Herstellung der SLN wurden daher im Folgenden LM verwendet, die bei RT auskristallisiert waren.

Dennoch war über die gesamte Lagerzeit zusätzlich ein Ausschleusen des P90H aus der LM zu erkennen, deshalb wurden in der Folge Untersuchungen zur Verbesserung der Löslichkeit von P90H sowohl in Lösungsmitteln als auch in der LM unternommen.

4.1.8 Zusammenfassende Diskussion der Untersuchungen der LM

Im ersten Ergebnisteil wurden LM, die bei RT (Reihe 1) oder unter Stickstoffmörserung (Reihe 2) rekristallisierten, physiko-chemisch charakterisiert. Durch TEM-Untersuchungen wurde bei beiden Reihen die typische schichtartige Anordnung der Triglyceridstruktur des S154 dargestellt. Diese wurde von Friedrich sowohl für bei Raumtemperatur erstarrte als auch bei mit Stickstoff schockgefrorenen Phospholipid-Hartfett-Mischungen beschrieben [Friedrich und Müller-Goymann 2003].

Mit thermoanalytischen Methoden wurde der Wärmefluss innerhalb der LM bei steigender Temperatur (DSC) und unter isothermen Bedingungen (TAM) gemessen. Die DSC-Versuche konnten bei beiden Reihen gleichermaßen innerhalb der ersten 2 Monate nach Herstellung der LM eine Ausbildung einer instabilen α -Modifikation nachweisen, die sich nach 3 Monaten in eine stabile β -Modifikation umgewandelt hatte (Ergebnisse nach einem und zwei Monaten Lagerzeit nicht aufgeführt). Diese im Vergleich zu reinem Hartfett beschleunigte Umwandlung in die stabile β -Modifikation kann auf den Einfluss des Phospholipids zurückgeführt werden, welches einen stabilisierenden Effekt auf das Hartfett ausüben könnte. Thoma und Serno konnten bereits 1983 feststellen, dass Phospholipide aus Sojalecithin schon bei 2 %igem Anteil in Hartfett-Suppositorien einen stabilisierenden Einfluss auf das Schmelzverhalten ausübten und die stabile β -Modifikation sich bei diesen phospholipidhaltigen Hartfettgrundmassen schon nach 3 Monaten Lagerzeit

einstellte. Mit DSC-Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Schmelzübergänge detektiert, die einerseits im Schmelzbereich von reinem S154 und andererseits ca. 10 °C unterhalb der Übergangstemperatur von reinem P90H lagen. Auf diesen Ergebnissen basierend wurde eine Interaktion der beiden Komponenten (S154 und P90H) vermutet, die sich in einer möglichen Mischkristallbildung mit Schmelzpunktsveränderung des reinen Phospholipids manifestierte. Auch die Berechnung der Kristallinitätsindices konnte diese Vermutung erhärten. LM, die bei RT rekristallisierten, zeigten eine um ca. 4 % verminderte Kristallinität und mit Stickstoff gemörserte LM ein ähnliches Resultat bei einer Reduktion der Kristallinität von ca. 5 %. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Mischkristallbildung des Hartfetts mit dem Phospholipid hin, bei der möglicherweise ca. 4 bzw. 5 % der LM als feste Lösung vorlagen.

Kurz nach der Herstellung konnten mit Hilfe der isothermen Mikrokalorimetrie keine Modifikationsänderungen innerhalb der LM aufgezeigt werden, was in Übereinstimmung mit Untersuchungen an LM und SLN-Dispersionen mit S154 und P90G steht [Schubert et al. 2005].

WAXD-Untersuchungen konnten die mit DSC erhaltenen Daten verifizieren. Innerhalb von drei Monaten nach der Herstellung der LM bildete sich ausgehend von einer instabilen α -Modifikation über eine metastabile β' -Modifikation die stabile β -Modifikation aus, die bereits von Thoma et al. 1983 beschrieben wurde. Die SAXD-Untersuchungen verliefen bei den verschiedenartig rekristallisierten LM unterschiedlich. Mit Stickstoff gemörserte Proben (Reihe 2) zeigten eine vermehrte Ausschleusung von P90H aus dem S154-Kristallgitter, wohingegen bei RT rekristallisierte LM eine lineare Aufweitung der Netzebenenabstände mit steigendem P90H-Gehalt aufwiesen. Dieses Phänomen könnte ebenfalls einer Mischkristallbildung zwischen S154 und P90H zugeschrieben werden. Da es nur teilweise zu einer Ausschleusung von P90H aus dem Kristallgitter des Hartfetts kam und P90H in Form separater Kristalle rekristallisierte, wäre eine Arzneistoffinkorporation in die LM bzw. die Lagerstabilität dieser LM im Falle der Reihe 1 begünstigt. Aus diesem Grund wurde in der Folge ausschließlich mit LM gearbeitet, die bei RT rekristallisierten.

4.2 Untersuchungen der S154-LM mit DMPC und P90H

4.2.1 Versuche zur Verbesserung der Löslichkeit von P90H

Phospholipon 90 G (P90G) ist als amphoterer Phospholipid mit ungesättigten Fettsäureresten in der Lage, in Lösungsmitteln wie IPM und MKT inverse Mizellen zu bilden [Papantoniou und Müller-Goymann 1995]. Allerdings gelingt dieses nicht mit P90H. Sowohl in IPM als auch in MKT konnten nicht einmal 0,01 % an P90H (m/m) gelöst werden. Das Phospholipid schied sich nach erfolgter Klarschmelze bei RT wieder als trübe Masse in den Lösungsmitteln ab. Um die Flexibilität der gesättigten Fettsäurereste zu erhöhen und auf diese Weise doch noch eine Lösungsvermittlung zu erreichen, wurde in verschiedenen Anteilen ein Phospholipid mittlerer Fettsäurekettenlänge (DMPC=C14) eingearbeitet, welches allerdings nicht wie erhofft zu einer Verbesserung der Löslichkeit von P90H in MKT und IPM führte. Dieser Ansatz erschien jedoch vielversprechend für eine Verbesserung des Einbaus von P90H in S154, so dass in weiteren Versuchen DMPC als Co-Phospholipid in die LM eingebaut wurde. Die über ein Zusammenschmelzen und Rekristallisieren erhaltenen ternären Mischungen enthielten 10 und 20 % P90H (m/m) und einen variierenden Anteil an DMPC und wurden WAXD-Messungen unterworfen.

4.2.2 WAXD-Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H

Das Röntgendiffraktogramm in Abb. 4.14 zeigt die WAXD-Daten der Reinsubstanzen DMPC, P90H und S154. Diese Aufnahme dient als Vergleich für die Mischungen aus den drei Komponenten. Die LM mit 10 % P90H ist in Abb. 4.15 dargestellt und zeigt den Einfluss des variierenden DMPC-Gehaltes (5, 10 und 15 % (m/m)). Im Vergleich zur Abb. 4.14, aber auch zu den bereits vorgestellten WAXD-Daten aus Kapitel 4.1.6, ist erkennbar, dass eine Interaktion aller drei Komponenten erfolgt ist. Der Reflex bei ca. 21° 2θ wird von zwei charakteristischen Schultern begleitet, die das Ausbilden der stabilen β -Modifikation beweisen [Hagemann 1988; Schubert et al. 2005]. Diese Dreierinterferenz konnte sich schon einen Monat nach Herstellung der LM ausbilden, wohingegen die LM ohne DMPC mindestens drei Monate benötigte. Die Bildung einer β -Modifikation ließ sich zudem durch den mit der Lagerzeit stärker werdenden Reflex bei $6,2^\circ$ 2θ belegen, der zu Lasten der Intensität des Reflexes bei $5,5^\circ$ 2θ die α -Modifikation zurückdrängte. Das gleiche Phänomen, eine Intensitätszunahme der $6,2^\circ$ -Interferenz und eine Intensitätsabnahme der $5,5^\circ$ -

Interferenz, ließ sich auch schon nach einmonatiger Lagerzeit mit steigender DMPC-Konzentration beobachten (s. Abb. 4.15). Die Interferenz bei $6,2^\circ$ 2θ beweist bei der reinen Komponente S154, dass diese ausschließlich in der β -Modifikation vorliegt. Außerdem ist der Reflex von reinem DMPC bei $6,8^\circ$ 2θ nicht mehr vorhanden, was auf einen Einbau des DMPC in die LM schließen lässt.

Die gleichen Ergebnisse erhielt man ebenfalls beim Auswerten der Diffraktogramme mit 20 % P90H in der LM. Bei ansteigenden DMPC-Konzentrationen stellte sich die stabile β -Modifikation schon einen Monat nach der Herstellung ein. Dies wird an dem in Abb. 4.16 dargestellten Diffraktogramm deutlich.

Wie in Abb. 4.15 und Abb. 4.16 herausgearbeitet werden konnte, scheint das gesamte DMPC in Interaktion mit P90H und S154 getreten zu sein. Um eine Unterschreitung der Nachweisgrenze auszuschließen, wurden binäre Mischungen aus DMPC und P90H bzw. S154 im Goniometer vermessen.

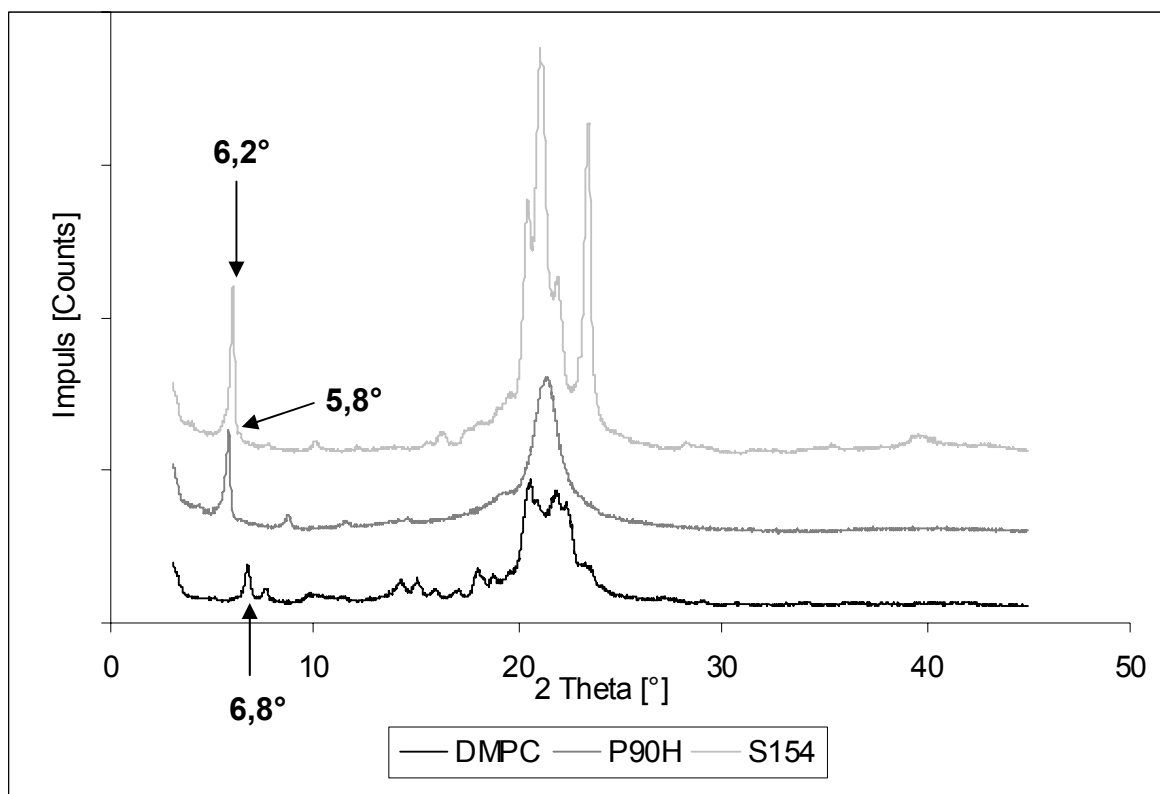


Abb. 4.14: WAXD-Diffraktogramm der Reinsubstanzen DMPC, P90H und S154 ohne Vorbehandlung.

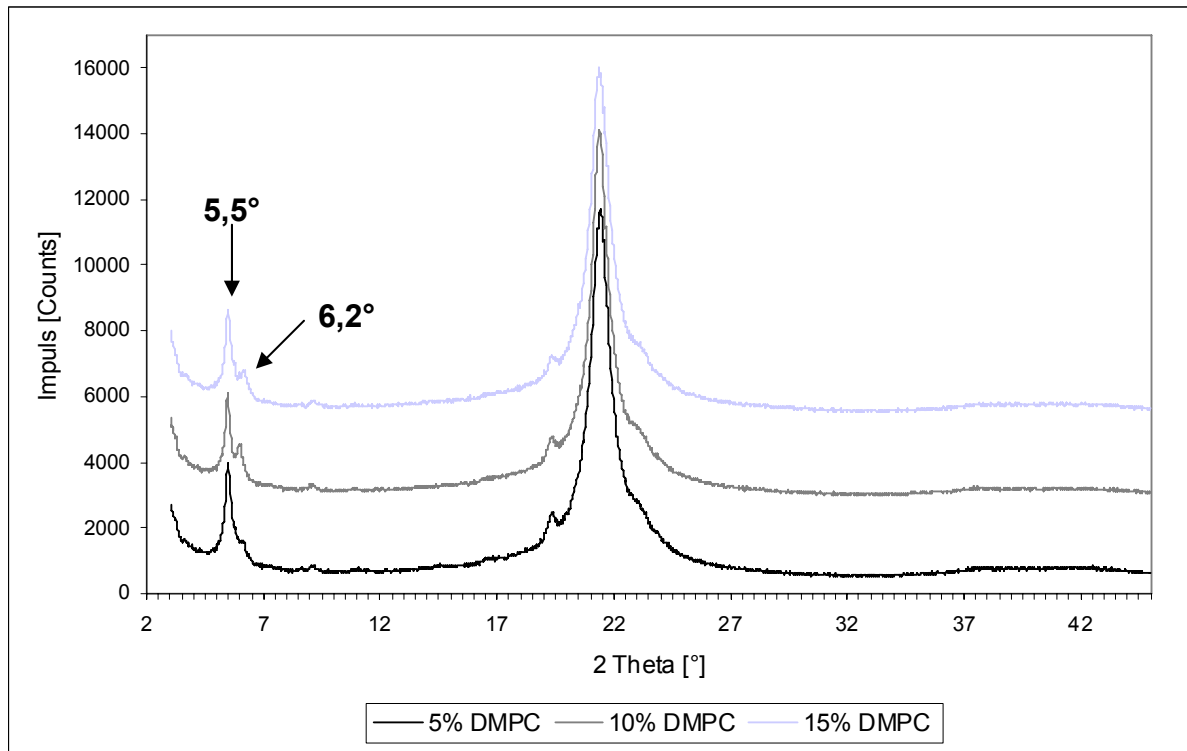


Abb. 4.15: WAXD-Diffraktogramm der S154-LM mit 10 % P90H und variierenden Konzentrationen an DMPC einen Monat nach der Herstellung.

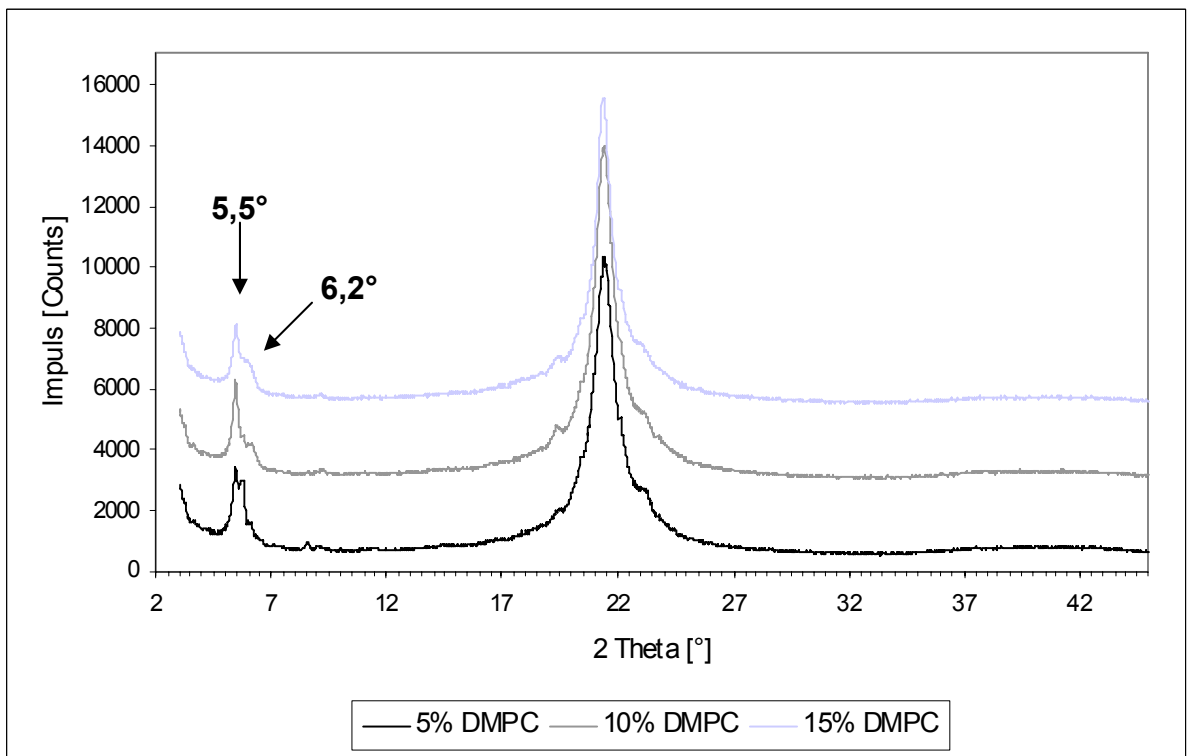


Abb. 4.16: WAXD-Diffraktogramm der S154-LM mit 20 % P90H und variierenden Konzentrationen an DMPC einen Monat nach der Herstellung.

In Abb. 4.17 sind binäre Mischungen von DMPC mit S154 bzw. P90H in den Verhältnissen nach dem Zusammenschmelzen und Rekristallisieren untersucht worden, wie sie schon in der Mischung mit allen drei Komponenten vorlagen. In der binären Mischung aus P90H und DMPC im Verhältnis 2:1 (PD 2-1) ist neben der P90H-Interferenz bei $5,8^\circ$ 2 Theta die auf $6,6^\circ$ verschobene Interferenz des DMPC detektierbar. Die letztgenannte Interferenz ist auch in der binären Mischung aus 15 % DMPC und 85 % S154 deutlich detektierbar, jedoch nur schwach angedeutet in der binären Mischung mit nur 5 % DMPC, wobei die Interferenzen bei $5,5^\circ$ und 21° die α -Modifikation des Hartfetts repräsentieren (s. Abb. 4.17). Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass in den ternären Mischungen alle Mischungspartner miteinander in Wechselwirkung treten, wobei eine separate Rekristallisation von DMPC keine Rolle zu spielen scheint, während die Rekristallisation der stabilen β -Modifikation der Triglyceride durch das Zusammenwirken aller Mischungspartner beschleunigt ist.

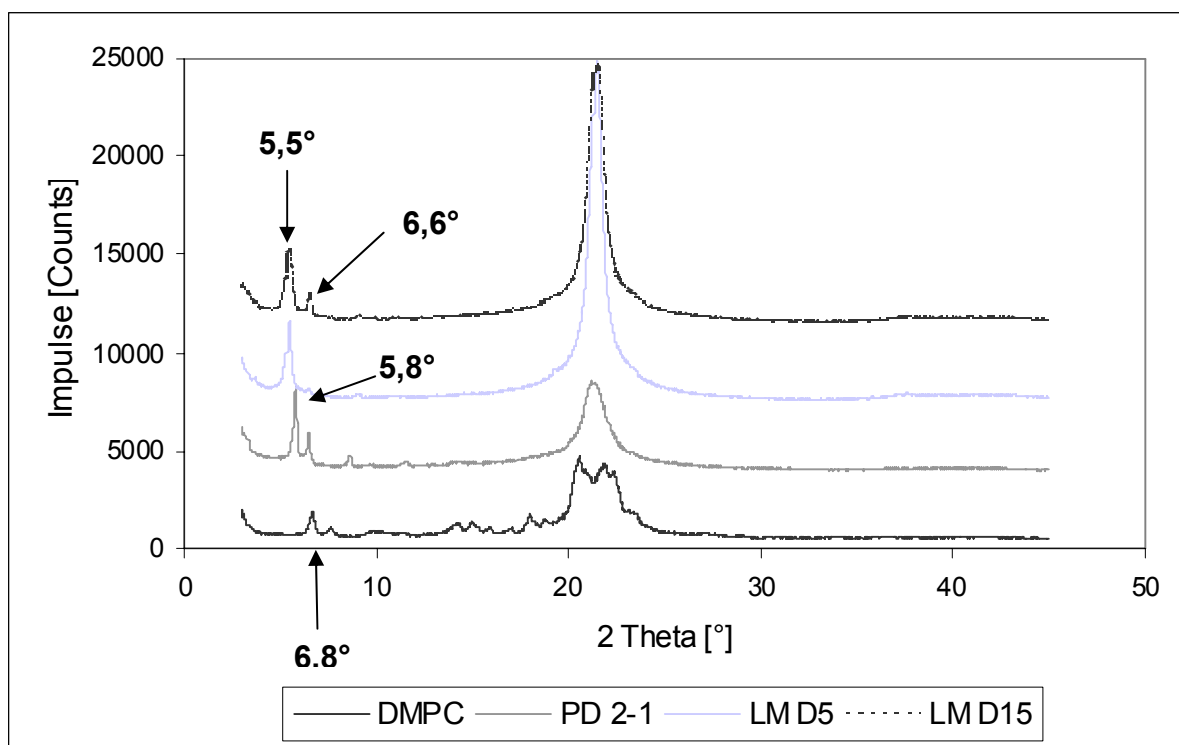


Abb. 4.17: WAXD-Diffraktogramm an binären Systemen aus DMPC und S154 (LM D5 mit 5 % und LM D15 mit 15 % DMPC in der LM) bzw. P90H (PD 2-1 bei einem Verhältnis P90H zu DMPC von 2:1). Die Untersuchungen wurden einen Tag nach der Herstellung gemacht.

Mit Hilfe von SAXD wurden die Systeme in der Folge in Hinblick auf ihre Fernordnung untersucht.

4.2.3 SAXD-Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H

Tabelle 4.1: Netzebenenabstände von reinem, unbehandeltem DMPC (SAXD).

Probe	Netzebenenabstand [nm]
DMPC	5,31
	4,65

Reines DMPC weist Netzebenenabstände von 4,65 und 5,31 nm auf (s. Tabelle 4.1), reines S154 bzw. reines P90H weisen Netzebenenabstände von 4,4 nm bzw. 5,8 nm auf. Nach einmonatiger Lagerung zeigten die ternären Systeme aus P90H, S154 und DMPC im Vergleich zu den binären LM aus P90H und S154 eine zusätzliche

Tabelle 4.2: Netzebenenabstände von binären Mischungen aus DMPC und S154 bzw. P90H nach dem Schmelzen und Rekristallisieren einen Tag nach der Herstellung.

Probe	Netzebenenabstand [nm]
LM aus S154 und 5 % DMPC	4,74
LM aus S154 und 10 % DMPC	4,83
LM aus S154 und 15 % DMPC	4,83
P90H und DMPC 1:1	5,96
P90H und DMPC 2:1	5,87
P90H und DMPC 4:1	6,11

Interferenz entsprechend einer Aufweitung, die allerdings vom Zusatz des P90H abhängig war (s. Abb. 4.18). Bei 20 % P90H in der LM konnte sich ein Netzebenenabstand von 6,1 nm bilden. Dieser Abstand zeigt den Einfluss des P90H, das sich, wie bereits in Abb. 4.12 dargestellt, mit zunehmender Lagerzeit vom S154 separiert und dabei Anteile desselben in sein Kristallgitter integriert. Der Netzebenenabstand des DMPC von 5,31 nm konnte nicht wieder gefunden werden. Es ist anzunehmen, dass ein quantitativer Einbau des DMPC in die verschiedenen Kristallgitter erfolgt ist. Die SAXD-Ergebnisse der binären Systeme von DMPC mit P90H bzw. S154 geben Aufschluss über die Netzebenenabstände der einzelnen Mischungen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Bei den Mischungen von S154 mit DMPC können unabhängig von der Konzentration des DMPC

Netzebenenabstände von ca. 4,8 nm bestimmt werden, wie es auch für binäre Mischungen aus S154 und P90H charakteristisch ist (s. Kapitel 4.1.7). Reines S154 besitzt einen Netzebenenabstand von 4,6 nm. In einer LM mit DMPC kam es zu einer Veränderung dieses Netzebenenabstands, was auf einen Einschluss des DMPC schließen lässt (s. Abb. 4.18). In der binären Mischung von P90H und DMPC lagen die Netzebenenabstände zwischen 5,9 und 6,1 nm und wiesen damit auf eine leichte Aufweitung des Netzebenenabstandes von reinem P90H hin (s. Abb. 4.12). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass DMPC sowohl in die LM aus P90H und S154 als auch in die Einzelkomponenten eingebaut wird.

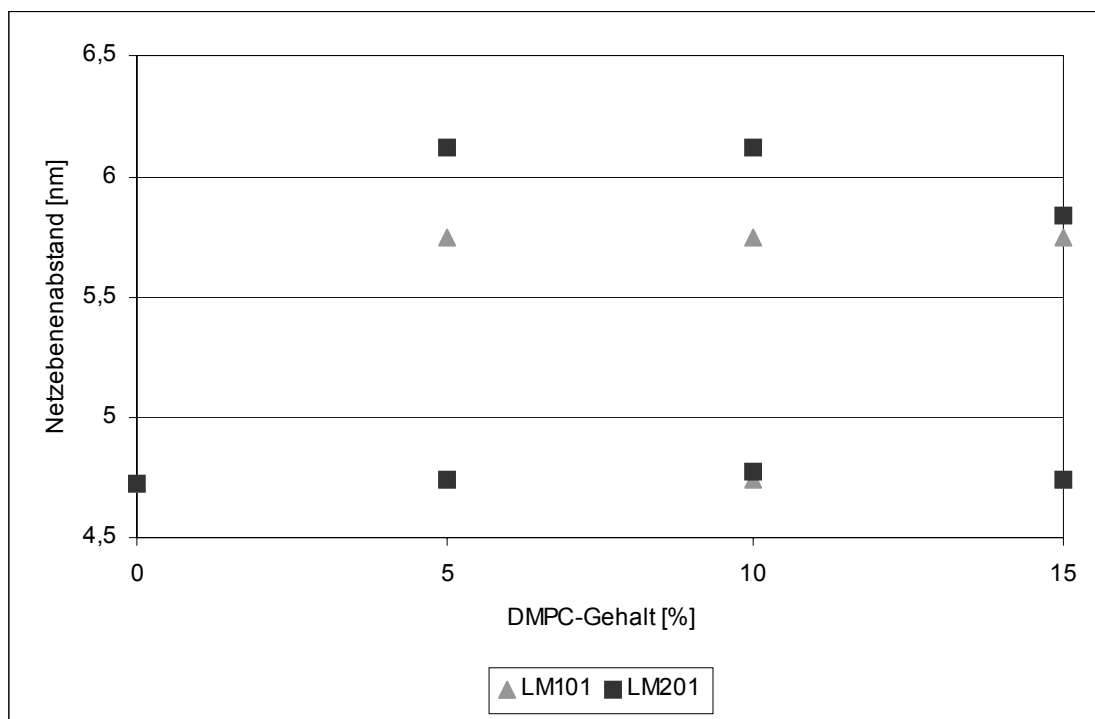


Abb. 4.18: Netzebenenabstände von LM mit 10 % P90H (LM101) und 20 % (LM201) in der LM mit 5, 10 bzw. 15 % DMPC. Die Lagerzeit betrug einen Monat.

4.2.4 Zusammenfassende Diskussion von Untersuchungen an S154-LM mit DMPC und P90H

Ausgangspunkt der Untersuchungen an S154-LM mit P90H und DMPC war der Versuch der Löslichkeitsverbesserung von reinem P90H in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. mittelkettigen Triglyceriden und Isopropylmyristat, mit einer möglichen Bildung von inversen Mizellen, welche auch schon bei Papantoniou und Müller-Goymann (1995) sowie Friedrich et. al (2000) mit arzneistofffreien und -haltigen P90G-Zubereitungen beschrieben wurden. P90H war in den angegebenen Lösungsmitteln jedoch nicht ausreichend löslich, so dass DMPC, ein Phospholipid mittlerer Kettenlänge, in Bezug auf mögliche Lösungsvermittler-Eigenschaften untersucht werden sollte.

Im Vergleich zu LM aus S154 und P90H (ohne DMPC), bei denen die Ausbildung der stabilen Modifikation nach 3 Monaten einsetzte, wandelten sich LM aus S154, P90H und DMPC schon nach einem Monat aus der instabilen α - in die stabile β -Modifikation um. Die Anwesenheit von DMPC in der LM sorgte somit für eine beschleunigte Bildung der stabilen Modifikation im Vergleich zu LM ohne DMPC.

Mit SAXD-Untersuchungen wurde festgestellt, dass kristallines DMPC nicht in der LM nachgewiesen werden konnte. Vielmehr wurde DMPC in die Kristallgitter von S154 und P90H eingebaut. Mit Röntgenkleinwinkelbeugungs-Untersuchungen des binären Systems (DMPC/ P90H bzw. DMPC/ S154) und der ternären LM (DMPC, P90H und S154) wurde die gegenseitige Wechselwirkung aller Bestandteile bewiesen. Ein Einbau mittelkettiger Phospholipide in die Hartfett-Lipidmatrix muss jedoch nicht unbedingt mit einer gesteigerten Beladungskapazität der Nanopartikel einhergehen, wie Jores et. al in Untersuchungen an plättchenartigen, festen Lipidnanopartikeln und nanostrukturellen Lipidcarriern (NLC) mit mittelkettigen Triglyceriden (MKT) bewiesen [Jores et al. 2003; Jores et al 2004]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen Glycerylbehenat als Lipid und das flüssige Neutralöl als mittelkettige Komponente eingesetzt, so dass diese Ergebnisse nicht unbedingt auf andere Lipide und Nanopartikelformulierungen übertragen werden können.

Nach der Charakterisierung der Lipidmatrices sollten diese zu Nanosuspensionen weiterverarbeitet werden. Als Vorstufe entstanden bei der Verarbeitung im Ultraturrax oberhalb des Schmelzpunkts der Lipidmischungen sogenannte Präemulsionen, die im folgenden Kapitel 4.3 nach Wasserentzug mittels TEM und WAXD charakterisiert wurden.

4.3 Untersuchungen der Präemulsionen

Präemulsionen sind die Vorstufe von SLN-Dispersionen, die aus der Schmelze von LM und wässriger Phase und der anschließenden Präemulgierung mit dem Ultraturrax erhalten werden. Sie werden üblicherweise im heißen Zustand im Hochdruckhomogenisator zu SLN weiterverarbeitet [Müller und Lucks 1996]. Da die Nanopartikel in einer wässrigen Dispersion vorliegen und bei der Hochdruckhomogenisation bei einer Temperatur von ca. 70 °C gearbeitet wird und eine erhöhte Luftfeuchtigkeit vorherrscht, sollte überprüft werden, ob der Einfluss der wässrigen Phase eine Veränderung in der Struktur der LM verursacht. Aus diesem Grund wurden Präemulsionen für 24 Stunden auf dem Sandbad getrocknet, was zu einer Koaleszenz der Partikel führte. Auf diese Weise lag erneut eine LM vor, welche für TEM- und Röntgenuntersuchungen präpariert und anschließend vermessen wurde.

4.3.1 TEM-Untersuchungen

Präemulsionen mit 5 % LM-Gehalt und mit 0-50 % P90H in der S154-LM wurden bei 70 °C für 24 Stunden getrocknet und im Hochvakuum einer Gefrierbruchanlage für TEM-Untersuchungen präpariert. In Abb. 4.19 ist die TEM-Aufnahme nach Trocknung einer Präemulsion mit 30 % P90H in der LM dargestellt. Trotz der 5 Minuten langen Scherung mit dem Ultra-Turrax vor dem Trocknungsprozess konnten keine partikulären Strukturen erkannt werden. Der typische schichtenartige Aufbau der LM, der bei Friedrich und Müller-Goymann (2003) dargestellt wird, war bei allen Präparationen gut erkennbar. Partikuläre Strukturen konnten aufgrund der Koaleszenz der Emulsionstropfen bei 70° C nicht visualisiert werden.

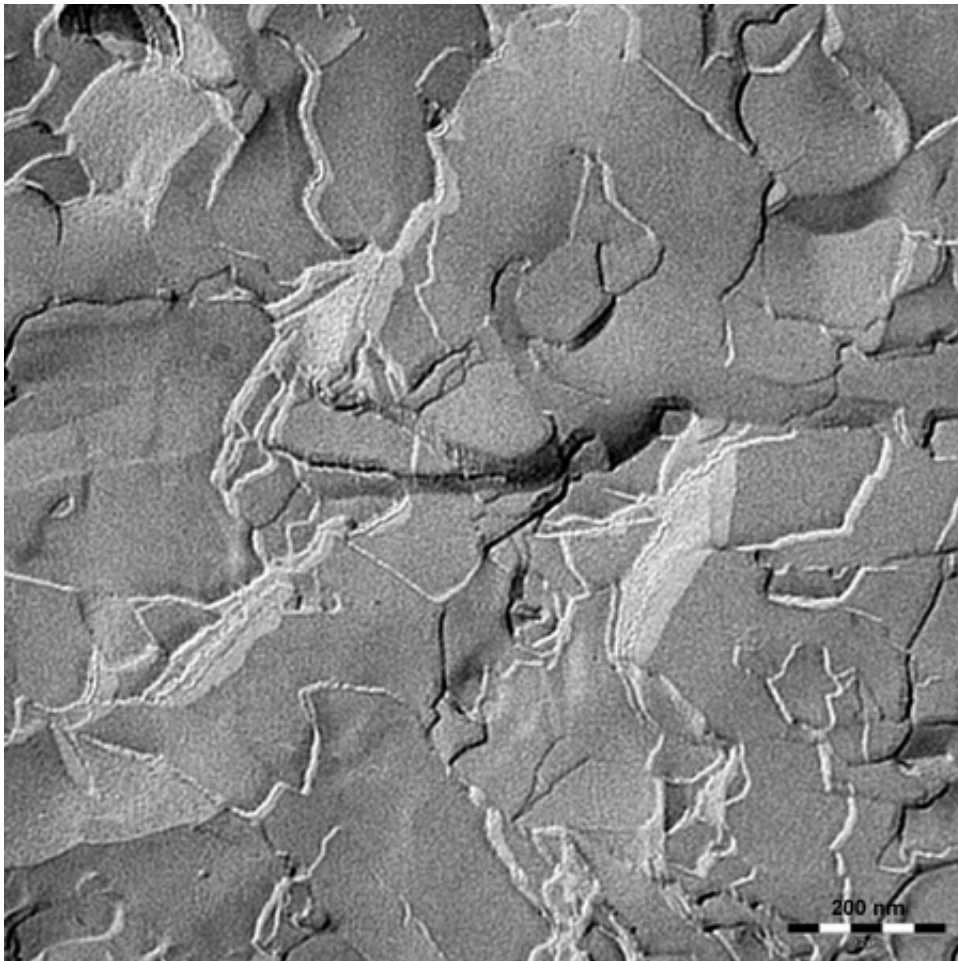


Abb. 4.19: TEM-Aufnahme einer getrockneten Präemulsion mit einer 5 %igen S154-LM mit 30 % P90H und 1 % Solutol in der wässrigen Phase.

4.3.2 WAXD-Untersuchungen unter Konditionierung

Die getrockneten Präemulsionen wurden unter einer relativen Luftfeuchtigkeit (rH) von 95 % bei 50 °C vermessen. Diese Temperatur liegt knapp unter der Schmelztemperatur von S154 (57,1 °C). Die Temperatur von 50 °C könnte schon ausreichen, um ein Anschmelzen des Lipids zu induzieren. Wie in Abb. 4.20 am Beispiel von 0 % und 50 % P90H erkennbar, gab es keine Lageveränderungen der Interferenzen. Die Netzebenenabstände deckten sich mit den Ergebnissen aus dem später dargestellten Kapitel 4.5.3.3. (S. 65). Es lag bei allen Proben im Konzentrationsbereich von 0-60 % P90H in der LM unmittelbar nach der Herstellung die stabile β -Modifikation vor. Demnach kam es unter erhöhten Temperaturen und erhöhter Luftfeuchtigkeit zu einer spontanen Ausbildung der stabilen Modifikation.

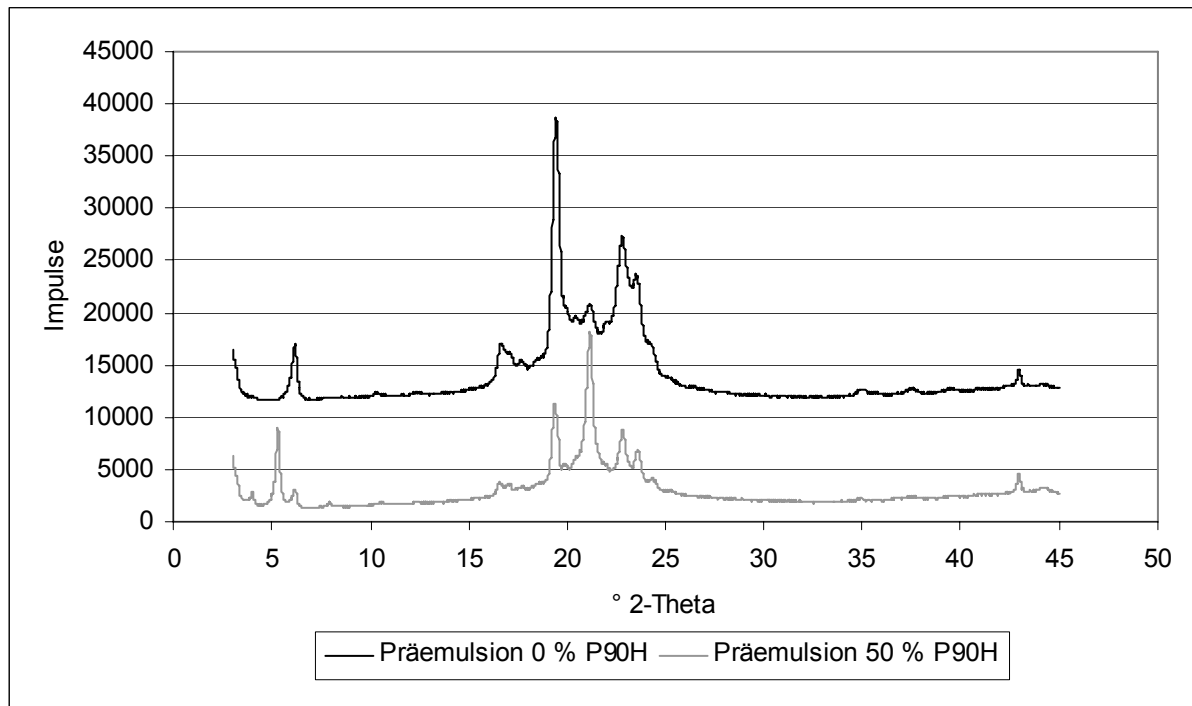


Abb. 4.20: WAXD-Diffraktogramm von SLN-Präemulsionen mit 0 bzw. 50 % P90H in der LM bei 95 % rH und 50 °C (THC).

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion von Untersuchungen der Präemulsionen

Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen konnte in der Lipidphase der Präemulsionen der typische schichtenartige Aufbau der LM sichtbar gemacht werden. Partikuläre Strukturen konnten aufgrund der Koaleszenz der Emulsionstropfen nicht gefunden werden.

Mit Hilfe von Röntgenweitwinkelbeugungs-Untersuchungen bei erhöhter Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden Temperaturbedingungen gewählt, die nah am Schmelzpunkt des reinen Hartfettes angesiedelt waren. Es wurde untersucht, ob die wässrige Phase der Präemulsion einen Einfluss auf die Modifikation des Hartfettes zur Folge haben könnte. Die Versuche zeigten, dass es unter Konditionierung zu einer beschleunigten Veränderung der Modifikation des Hartfettes kam, da sich die stabile β -Modifikation direkt nach der Herstellung eingestellt hatte. Es bleibt festzuhalten, dass der Einfluss des Wassers und der hohen Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf die Modifikationseinstellung in der LM besitzen.

Im nächsten Abschnitt wird die Herstellung und Charakterisierung von SLN und anschließend von SLN-Variationen thematisiert.

4.4 Herstellung und Charakterisierung der SLN-Dispersionen

Nach den Untersuchungen zur LM wurden SLN-Dispersionen hergestellt und physiko-chemisch charakterisiert. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der LM-Untersuchungen wurden zur Herstellung der SLN die LM der Reihe 1 verwendet.

Die SLN wurden mit maximal 20 % P90H in der LM und einem Gesamtgehalt an LM von 5 % in der Nanodispersion hergestellt. Eine Erhöhung des LM- oder Lecithinanteils führte bereits bei der Präemulsions-Herstellung zu halbfesten Systemen, die per Hochdruckhomogenisation nicht zu Nanopartikel-Dispersionen weiterverarbeitet werden konnten. Die Standardformulierung enthielt 1 % Solutol und 0,005 % Thiomersal.

Im Vorfeld zu den Partikelgrößenmessungen wurden TEM-Aufnahmen der SLN gemacht.

4.4.1 TEM-Untersuchungen

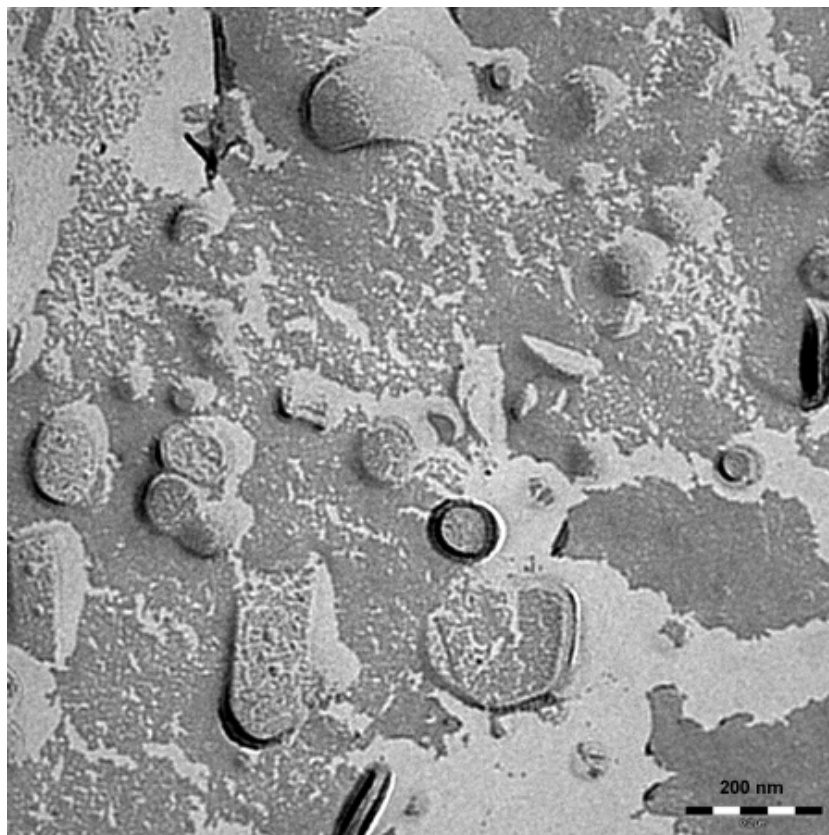


Abb. 4.21: TEM-Aufnahme von SLN mit 10 % P90H in der LM.

Mit Hilfe von TEM-Aufnahmen wurden SLN-Proben untersucht. Die TEM-Aufnahme aus Abb. 4.21 von SLN mit 10 % P90H in der LM zeigte nanopartikuläre Strukturen, die sich im Bereich von 150 nm bewegten. Auffällig war, dass vorwiegend rundliche Partikel zu erkennen waren und wenig seitlich bei der Präparation getroffene Scheibchen beobachtet werden konnten. Im Unterschied zu den Ergebnissen der Systeme mit P90G scheint sich bei Einsatz von P90H eine stärker abgerundete Partikelform zu ergeben. Diese kann möglicherweise auf die flexiblere Struktur der gesättigten Fettsäuren im P90H zurückgeführt werden, die aufgrund einer variablen Ausrichtung der P90H-Kohlenwasserstoffketten im Vergleich zu den ungesättigten Fettsäureresten des P90G möglich ist. Eine runde Partikelform kann in diesem Fall anstelle einer scheibchenartigen Form vorrangig gebildet werden. In der Folge wurden PCS-Untersuchungen an den SLN-Dispersionen durchgeführt.

4.4.2 Partikelgrößenbestimmung der Standardformulierung

In Abb. 4.22 sind die Standardformulierungen in einer Langzeitmessung abgebildet. Die Zubereitung mit 10 % P90H in der LM war dabei über den gesamten betrachteten Zeitraum von 5 Monaten in Bezug auf ihren hydrodynamischen Durchmesser konstant und wies einen Polydispersitätsindex von unter 0,25 auf.

Dieser Wert spricht zwar nicht für eine Monodispersität der Nanopartikel, jedoch für eine für parenteral zu applizierende Arzneiformen tolerierbare, enge Partikelgrößenverteilung. Es ist davon auszugehen, dass diese Zubereitung über den aufgeführten Lagerzeitraum von 5 Monaten stabil bleibt.

Die Formulierung mit 20 % P90H in der LM bildete nach der Hochdruckhomogenisation zwar um ca. 50 nm kleinere Partikel, jedoch lag die Partikelgrößenverteilung schon zu Beginn der Messreihe höher als die der Formulierung mit 10 % P90H in der LM (s. Abb. 4.22). Nach fünfmonatiger Lagerzeit wurde sogar eine Partikelgrößenverteilung über dem kritischen Wert von 0,300 erhalten, was eine weitere Lagerung der Partikel als nicht sinnvoll erscheinen lässt.

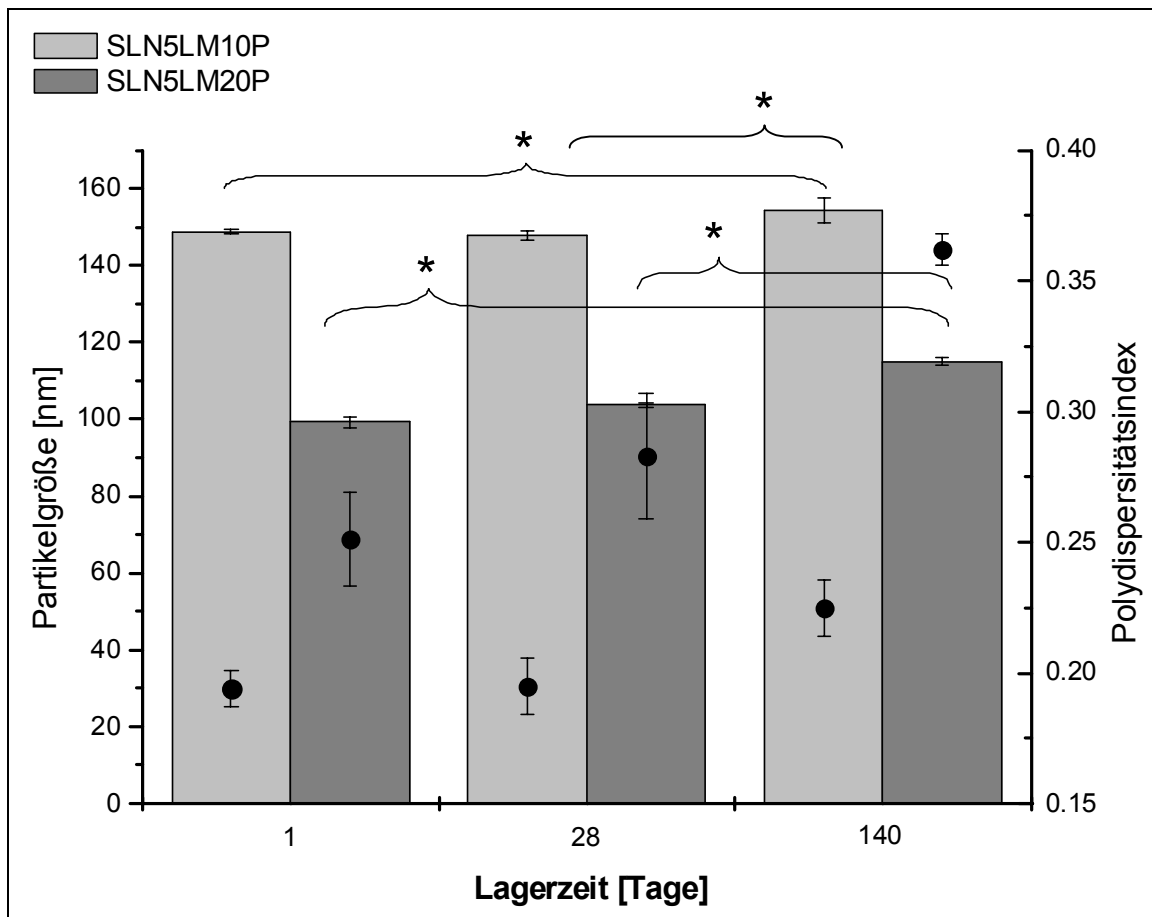


Abb. 4.22: PCS-Bestimmung der Standardformulierungen mit jeweils 5 % S154-LM bei einem Gehalt von 10 (SLN5LM10P) bzw. 20 % P90H (SLN5LM20P). In beiden Rezepturen war jeweils 1 % Solutol HS 15 enthalten. Die Partikelgröße (Säulen, linke Ordinate) und der Polydispersitätsindex (Punkte, rechte Ordinate) wurden gegen die Lagerzeit aufgetragen (n=6, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * = signifikanter Unterschied bei $\alpha=0,05$).

4.4.3 TAM-Untersuchungen

Ähnlich wie bei den TAM-Untersuchungen der LM (s. Kapitel 4.1.5) zeigten sich bei den Thermogrammen der SLN mit 10 und 20 % P90H keine Auffälligkeiten (s. Abb. 4.23). Es kam zu einer kontinuierlichen Abnahme des Wärmeflusses mit der Zeit. Es waren mit fortschreitender Kristallisation keine Veränderungen erkennbar. Es gab wie schon bei den Untersuchungen der LM keinen Hinweis z.B. auf eine Modifikationsänderung.

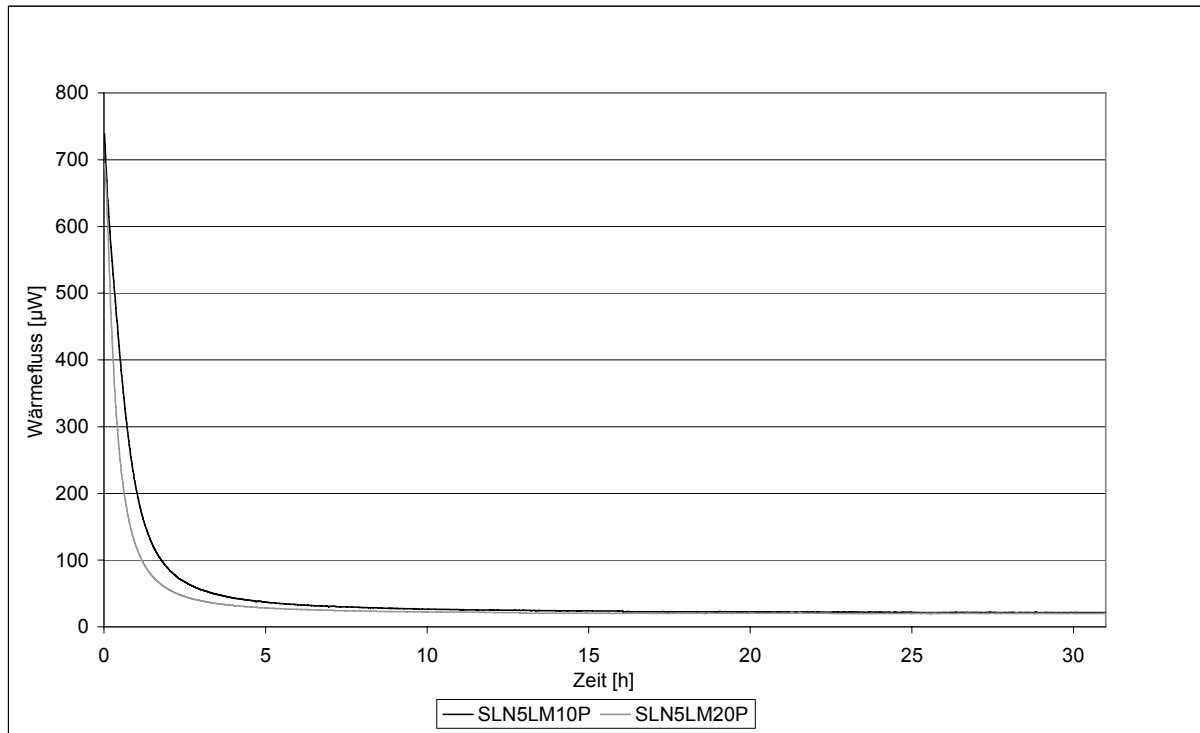


Abb. 4.23: Thermogramme von SLN mit 10 bzw. 20 % P90H mit 1 % Solutol über einen Zeitraum von 31 Stunden, Beginn der Messung nach 30 Minuten Äquilibrationszeit direkt nach der Herstellung.

4.4.4 Zusammenfassende Diskussion zur Herstellung und Charakterisierung von SLN-Dispersionen

Es wurden SLN-Dispersionen mit einem fünfprozentigen LM-Anteil aus S154 und 10 bzw. 20 % P90H hergestellt. Die Standardformulierung enthielt außerdem 1 % Solutol HS 15 als Emulgator und 0,005 % Thiomersal als Konservierungsmittel in der wässrigen Phase. SLN-Dispersionen, die 10 % P90H in der LM enthielten, besaßen eine Partikelgröße von ca. 150 nm, wohingegen SLN mit 20 % P90H in der LM einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ca. 100 nm aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden sowohl mit PCS-Messungen als auch in TEM-Aufnahmen erhalten. SLN-Dispersionen, die 10 bzw. 20 % P90G in der LM (5 %) enthielten, besaßen Partikelgrößen von etwa 260 bzw. 150 nm [Schubert und Müller-Goymann 2005]. Bei RT gelagerte SLN zeigten im Mittel bei ca. einem halben Jahr Lagerzeit noch ausreichend monodispers verteilte Partikelgrößen, die eine parenterale Applikation erlauben würden. Um einen Einfluss unterschiedlicher Herstellungsmethoden, Hilfsstoffe oder Hilfsstoffkonzentrationen auf die physiko-chemischen Eigenschaften der SLN ausarbeiten zu können, wurden in der Folge verschiedene SLN-Variationen bearbeitet.

4.5 Untersuchungen von SLN-Variationen

Die Herstellung der Standardformulierung wurde in der Folge durch Änderung des Homogenisators, des Konservierungsmittels, des Solutol-Gehaltes, der Homogenisationsdauer und des LM-Anteils variiert.

4.5.1 Variation des Homogenisators

Die Variation der Herstellungsmethode erfolgte über den Vergleich des standardmäßig eingesetzten Hochdruckhomogenisators Emulsiflex von Avestin mit dem APV-2000 der Firma APV, welcher dem Institut leihweise zur Verfügung stand. In ersten Voruntersuchungen wurden die erhaltenen SLN-Proben mit 10 bzw. 20 % P90H in der LM per Partikelgrößenmessung und Röntgenuntersuchungen miteinander verglichen.

4.5.1.1 Partikelgrößenbestimmung

In Abb. 4.24 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung der Standardrezeptur dargestellt, die mit zwei unterschiedlichen Homogenisatoren hergestellt worden sind.

Die SLN, die 20 % P90H in der LM enthielten, besaßen einen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von ca. 100 nm unabhängig von der Herstellungsweise. Nanosuspensionen, die 10 % P90H in der LM enthielten, wiesen eine Partikelgröße von ca. 150 nm auf. Die Hochdruckhomogenisatoren APV-2000 und Emulsiflex zeigten hinsichtlich des Ergebnisses keine signifikanten Unterschiede, was sich mit Untersuchungen von Liedtke et al. (2000) beim Vergleich des Avestin Emulsiflex mit dem Micron Lab 40 der APV deckt. Die Partikelgrößenverteilung der Zubereitungen lag bei den untersuchten Proben im Mittel jeweils unterhalb von 0,200, was für eine enge und nahezu monodisperse Verteilung der Partikel spricht (s. Abb. 4.24).

Die Hochdruckhomogenisatoren unterschieden sich zwar nicht in der Effizienz, jedoch konnten mit dem APV-2000 Probenvolumina ab 100 mL verarbeitet werden. Der Emulsiflex ist für ein Probenvolumen von ca. 20-50 mL ausgelegt, war jedoch leichter zu handhaben als der APV-2000.

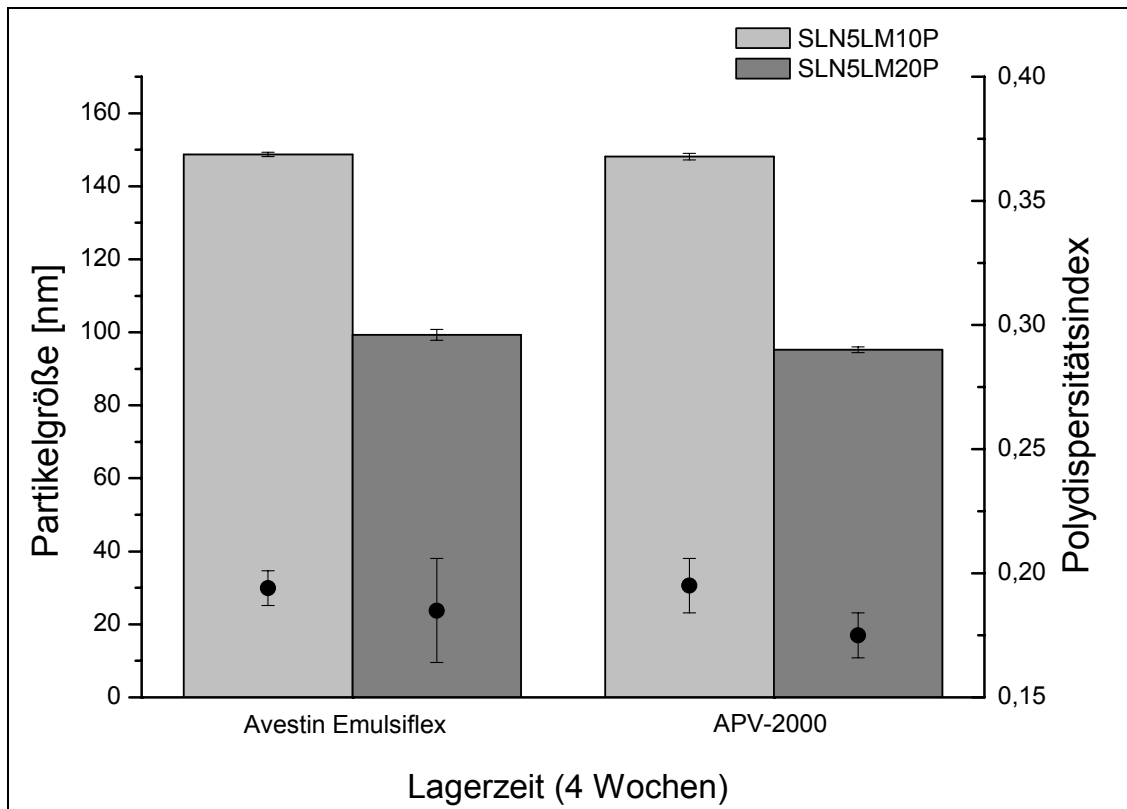


Abb. 4.24: PCS-Bestimmung der Standardformulierung mit 10 bzw. 20 % P90H in der S154-LM bei einem Solutol-Gehalt von 1 % nach Herstellung mit zwei unterschiedlichen Hochdruckhomogenisatoren, n=6.

4.5.1.2 WAXD-Untersuchungen

Mit Hilfe von WAXD wurde überprüft, ob die Variation des Hochdruckhomogenisators Auswirkungen auf die Kristallstruktur der SLN hat. In Tabelle 4.3 sind die charakteristischen Interferenzen über ihre Position 2θ [°] und der daraus resultierende Netzebenenabstand [nm] angegeben. Es waren bei allen Proben Interferenzen entsprechend 0,37, 0,41, 0,43 und 0,46 nm zu finden, welche über den gesamten bisher betrachteten Lagerzeitraum konstant blieben und über den zunehmenden Zeitverlauf insbesondere an der Position $19,4^\circ 2\theta$ an Intensität gewannen. Dieser Reflex ist, wie schon in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, ein Beweis für eine in den Nanosuspensionen spontan erfolgende Ausbildung der stabilen β -Modifikation.

Tabelle 4.3: WAXD-Untersuchungen der SLN-Standardformulierung unter Variation des Hochdruckhomogenisators einen Tag bzw. einen Monat nach der Herstellung.

	1 Tag nach Herstellung		1 Monat nach Herstellung	
	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]
SLN 10%P90H Emulsiflex	24,2	0,37	24,2	0,37
	21,8	0,41	21,8	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H Emulsiflex	24,2	0,37	24,2	0,37
	21,8	0,41	21,8	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 10%P90H APV-2000	24,2	0,37	24,2	0,37
	21,8	0,41	21,8	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,3	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H APV-2000	24,2	0,37	24,2	0,37
	21,8	0,41	21,8	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46

4.5.1.3 SAXD-Untersuchungen

Im vorliegenden Kapitel wird überprüft, welche Auswirkungen die Verwendung unterschiedlicher Homogenisatoren auf die Fernordnung der rekristallisierten Lipide hat. S154 weist nach Aufschmelzen und Rekristallisation einen Netzebenenabstand von 4,4 nm auf. P90H besitzt einen Netzebenenabstand von 5,8 nm. Lipidnanosuspensionen, die 10 bzw. 20 % P90H in der LM enthielten, zeigten einen um 0,1 bis 0,5 nm vergrößerten Netzebenenabstand (Abb. 4.25 sowie Kapitel 4.5.3.4). Diese Erweiterung war auf eine Interaktion der Lipid- und der Phospholipidkomponenten in der LM bzw. in der Nanosuspension zurückzuführen. Eine Zunahme der Netzebenenabstände konnte sowohl bei den Nanosuspensionen, die standardmäßig im Emulsiflex von Avestin hergestellt worden sind, als auch bei den SLN-Dispersionen, die dem APV-2000 entstammten, beobachtet werden. Ein Einfluss der Lagerzeit auf die Aufweitung der Netzebenenabstände konnte einen Monat nach der Herstellung noch nicht festgestellt und beurteilt werden. Es war jedoch auffällig, dass die SLN-Dispersionen mit 10 % P90H in der LM, die im Emulsiflex hergestellt wurden, sowohl einen Tag als auch einen Monat nach Herstellung eine größere Aufweitung des Netzebenenabstandes aufwiesen als SLN-Dispersionen mit 20 % P90H in der LM. Diese Beobachtungen wichen insofern von den Ergebnissen der SAXD-Untersuchungen an LM mit S154 und P90H aus Kapitel 4.1.7. ab, als es dort zu einer stärkeren Aufweitung der Netzebenenabstände mit höherem P90H-Anteil in

der LM kam. Allerdings konnte eine Linearität erst ein Jahr nach Herstellung entdeckt werden, nach einem Tag und nach 3 Monaten waren die Netzebenenabstände identisch. Hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften der SLN-Dispersionen mit 20 % P90H in der LM lieferten die Homogenisatoren von Emulsiflex und APV einen Monat nach Herstellung vergleichbare Netzebenenabstände.

In der Folge wurde eine Alternative zum standardmäßig in der Formulierung eingesetzten Konservierungsmittel Thiomersal gesucht. Eine Liste, in der die Konservierungsmittel und die eingesetzten Konzentrationen aufgeführt sind, befindet sich in Tabelle 3.2 in Abschnitt 3.2.4.

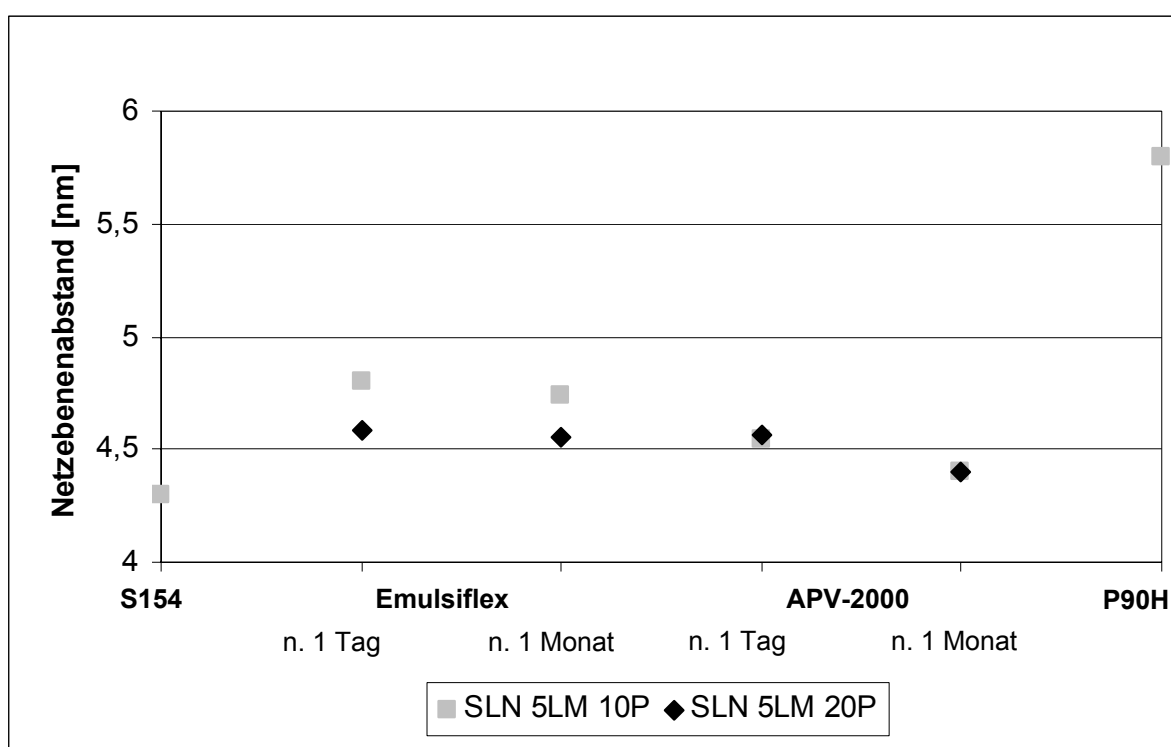


Abb. 4.25: Netzebenenabstände von SLN mit 10 % P90H (10P) und 20 % (20P) in der LM einen Tag bzw. einen Monat nach der Herstellung unter Variation der Hochdruckhomogenisatoren. Zum Vergleich ist der Netzebenenabstand von S154-Bulk aufgeführt.

4.5.2 Variation des Konservierungsmittels

4.5.2.1 Partikelgrößenbestimmung

In Abb. 4.26 und Abb. 4.27 sind die Partikelgrößen der SLN-Formulierungen aufgeführt, die mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln variiert worden sind. Im Vergleich standen diese Formulierungen zu der Standardformulierung, die als

Konservierungsmittel Thiomersal enthielt. SLN-Dispersionen mit 10 % P90H in der LM besaßen eine Partikelgröße von ca. 150 nm, wohingegen die Systeme mit 20 % P90H in der LM eine Größe von ca. 100 nm aufwiesen (s. a. Abb. 4.22). Nipagin und Nipasol gehören zur Stoffgruppe der Parahydroxybenzoesäureester (Parabene). Wurden diese einzeln oder in Kombination miteinander und/ oder Benzylalkohol (BA) in die Formulierung eingebracht, ergab sich eine Verschlechterung der Ergebnisse im Vergleich zur Standardformulierung. Die Partikelgrößenverteilung war bei den parabenhaltigen Zubereitungen relativ breit, entsprechend von 0,250 bis 0,4, was für eine nicht mehr monodispers verteilte Nanosuspension spricht. Im Fall der SLN-Zubereitung mit 20 % P90H in der LM und der Konservierungsmittelkombination Nipagin/ Nipasol/ Benzylalkohol (Nip/ Nip/ BA) war die Zubereitung instabil und lieferte keine vermessbare Suspension (s. Abb. 4.26).

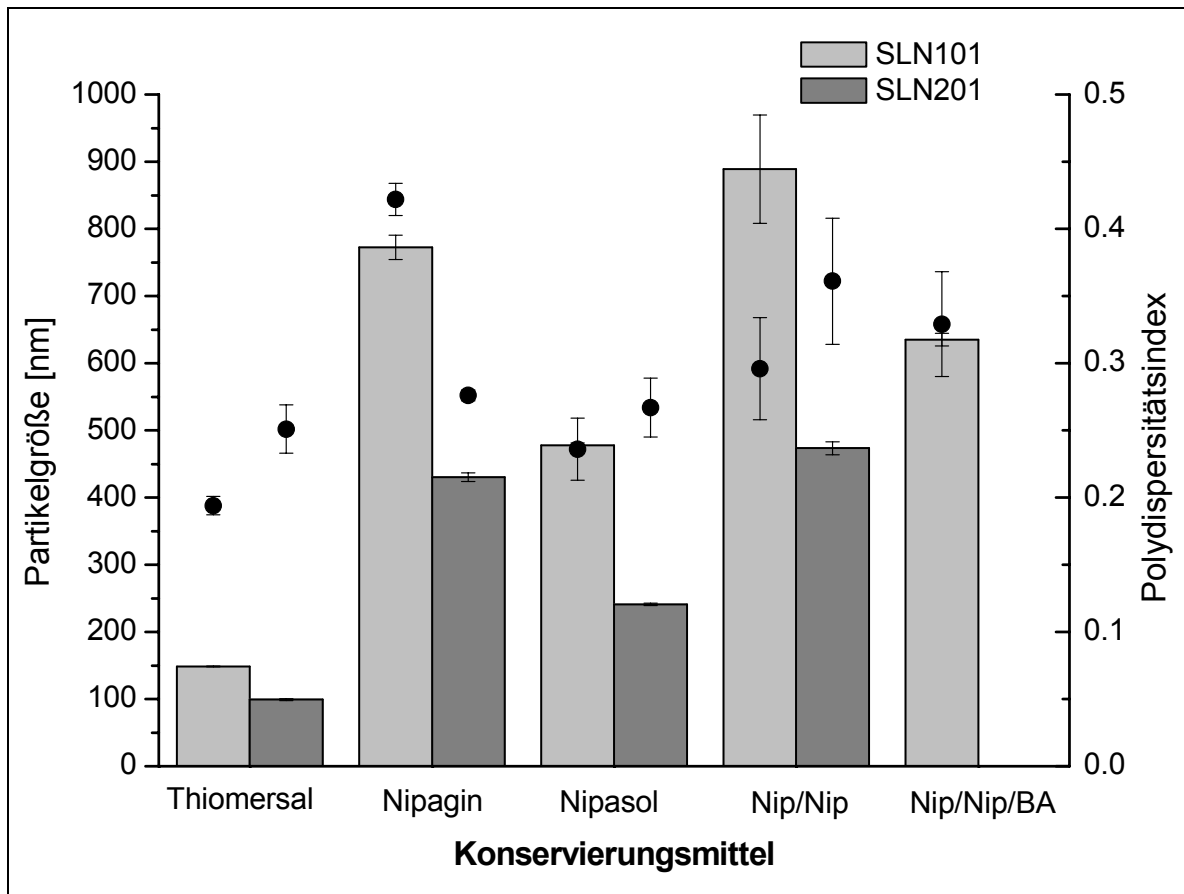


Abb. 4.26: PCS-Bestimmung von SLN mit 10 %P90H (SLN101) bzw. 20 % P90H in der LM (SLN201) mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln. Die Standardformulierung enthält Thiomersal als Konservierungsmittel, n=3.

In Abb. 4.27 wurden mit Benzylalkohol und den quartären Ammoniumsalzen Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid konservierte Nanosuspensionen mit unkonservierten, strahlensterilisierten SLN und der Standardformulierung verglichen. Die strahlensterilisierten Zubereitungen waren in Partikelgröße und Polydispersitätsindex mit der Standardformulierung gleichzusetzen. In Gegenwart der quartären Ammoniumsalze und des Benzylalkohols konnten die Systeme nicht ausreichend stabilisiert werden. Die Partikelgrößen dieser Nanosuspensionen lagen im Bereich von 200 bis 350 nm, wobei Polydispersität gegeben war. Das quartäre Ammoniumsalz Benzalkoniumchlorid sorgte für eine Vergrößerung der Partikelgröße auf ca. 350 nm in Suspensionen, die 20 % P90H in der LM enthielten. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf eine Unverträglichkeit des kationischen Konservierungsmittels mit dem amphoteren Phospholipid zurückzuführen, welche bei steigendem P90H-Gehalt deutlicher hervortrat.

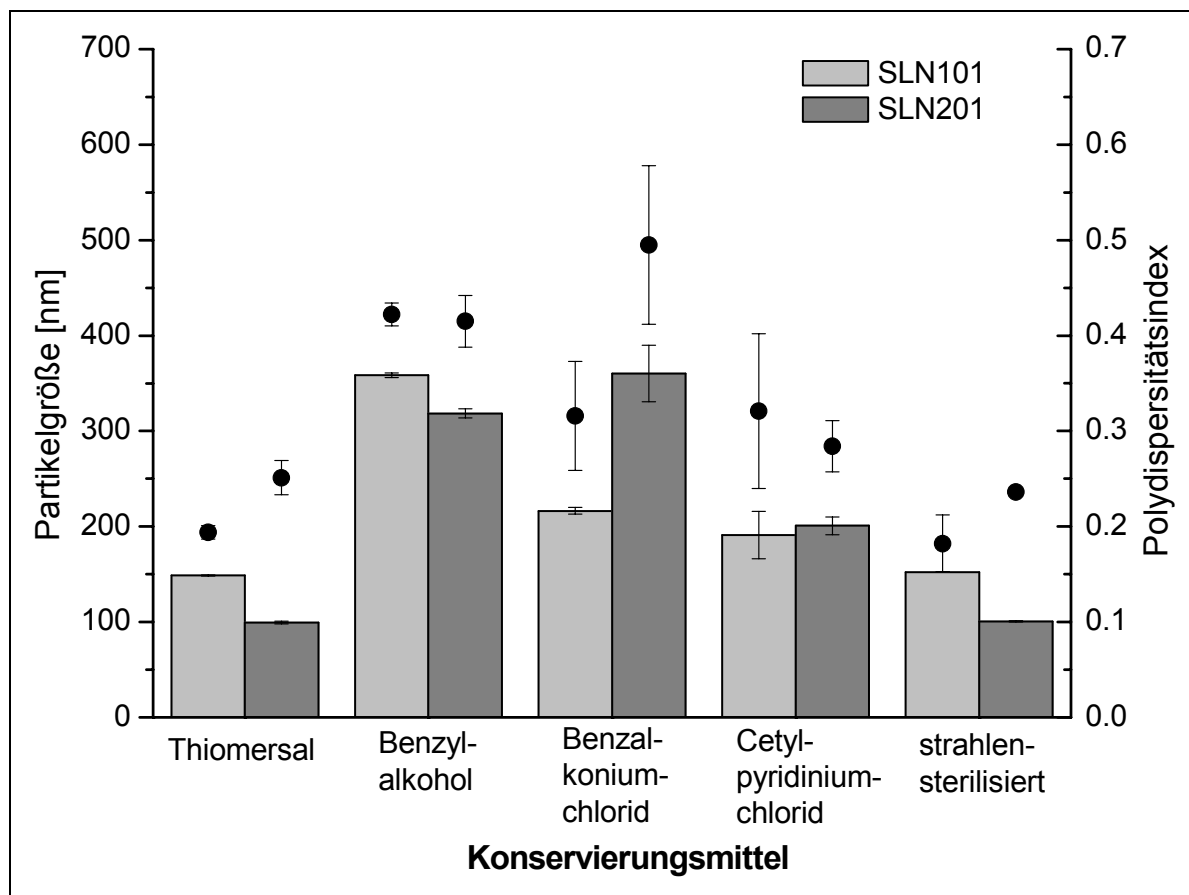


Abb. 4.27: PCS-Bestimmung von SLN mit 10 %P90H (SLN101) bzw. 20 % P90H in der LM (SLN201) mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln bzw. nach Strahlensterilisation. Die Standardformulierung enthält Thiomersal als Konservierungsmittel, n=3.

Da die Nanosuspensionen ohne Konservierungsmittel die besten Ergebnisse bezüglich der Partikelgröße und der Verteilung lieferten, wurden in der Folge unkonservierte Nanosuspensionen auf Kontamination durch Mikroorganismen und Keimwachstum überprüft (s. Kapitel 4.6).

4.5.3 Variation der Emulgatorkonzentration

4.5.3.1 Partikelgrößenbestimmung

In Abb. 4.28 ist der z-Average von SLN-Dispersionen mit 5 % LM und 1 bzw. 3 % Solutol aufgezeichnet, wobei die LM 10 bzw. 20 % P90H enthielten (SLN10P1S enthielt z.B. 10 % P90H und 1 % Solutol). Mit steigendem P90H- und Solutol-Anteil wurden die Partikel kleiner. Die Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Partikelgrößen über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten unverändert blieben. Der Polydispersitätsindex überschritt bei der SLN-Dispersion mit 20 % P90H in der LM und 3 % Solutol den kritischen Wert von 0,3. Eine enge Partikelgrößenverteilung war bei dieser Formulierung nicht gegeben.

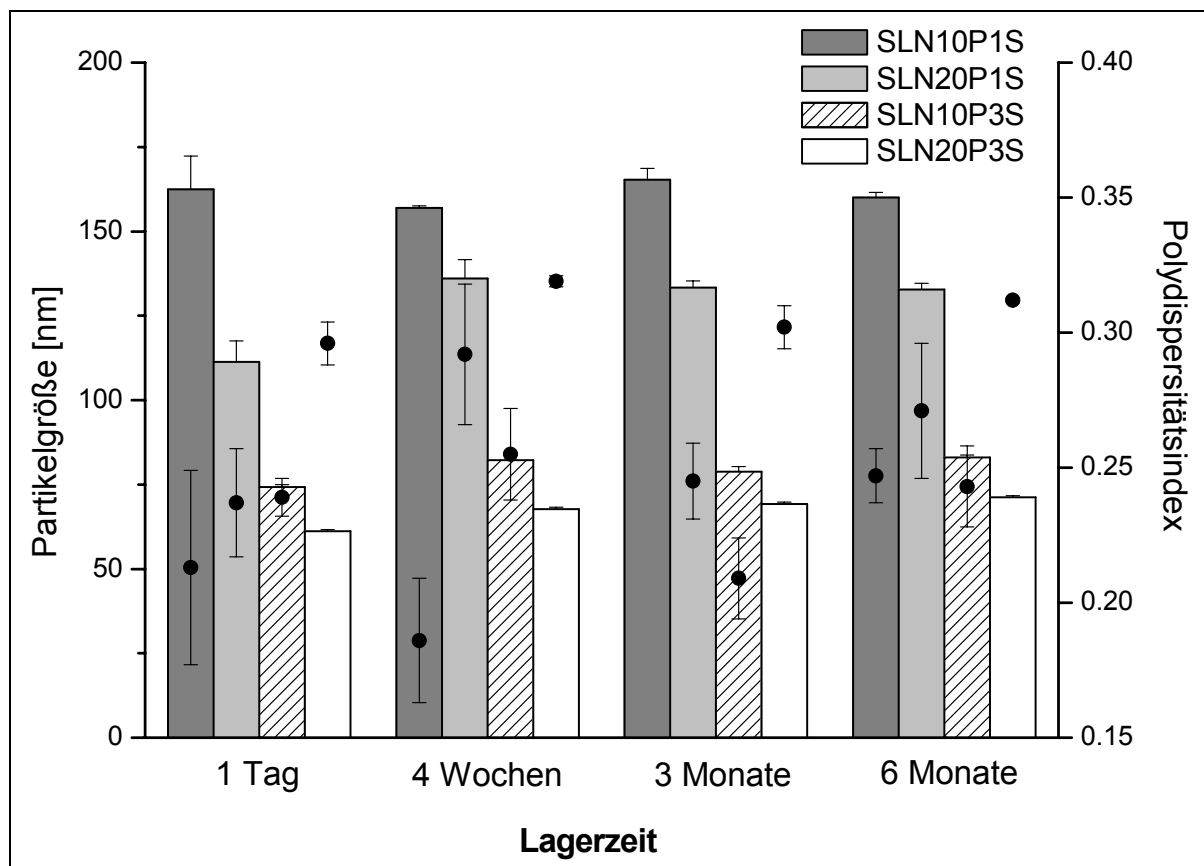


Abb. 4.28: PCS-Partikelgrößenbestimmung von SLN mit 10 bzw. 20 % P90H und 1 bzw. 3 % Solutol über einen Lagerzeitraum von 6 Monaten, n=6.

Im Anschluss an die Partikelgrößenbestimmungen wurden DSC-Untersuchungen durchgeführt, mit denen eine Charakterisierung des Schmelzverhaltens der SLN vorgenommen wurde.

4.5.3.2 DSC-Untersuchungen

Das Schmelzverhalten von SLN unterschied sich deutlich von dem des Hartfett-Bulkmaterials, wie man in Abb. 4.29 erkennen kann. In dieser Abbildung ist exemplarisch ein Vergleich zwischen SLN-Dispersionen mit unterschiedlichem Emulgatorgehalt (1 bzw. 3 % Solutol) und reinem S154-Bulkmaterial einen Monat nach Herstellung dargestellt. Alle betrachteten SLN-Dispersionen zeigten allgemein eine Verschiebung des Schmelzübergangs hin zu niedrigeren Temperaturen. Dies ist auf die kleinen Partikelgrößen aufgrund des höheren Tensidgehalts zurückzuführen. Kleinere Partikel besitzen im Verhältnis zu größeren Partikeln bzw. dem Bulkmaterial eine größere Oberfläche und schmelzen somit aufgrund der besseren Wärmeübertragung zu einem früheren Zeitpunkt, was mit den Ergebnissen von Westesen et al. (1997) korreliert.

Eine Erhöhung des P90H- und des Solutol-Gehaltes führten zu einer Verkleinerung der Partikelgröße (s. Abb. 4.28) und demzufolge zu einer entsprechenden Schmelzpunktdepression. Allerdings konnten diese Verschiebungen des Schmelzpunktes erst bei Partikelgrößenunterschieden von mehr als etwa 50 nm deutlich detektiert werden. Bei Partikelgrößenunterschieden unterhalb von 50 nm konnte eine Schmelzpunktdepression nur tendenziell festgestellt werden, so dass sowohl eine Erhöhung der P90H-Konzentration als auch eine Erhöhung der Solutol-Konzentration von 1 auf 3 % zu einer Verringerung des Schmelzpunktes führte. Eine Schmelzpunktdepression ist somit anscheinend ausschließlich auf Partikelgrößeneffekte zurückzuführen.

Nach den thermoanalytischen Untersuchungen der SLN mit unterschiedlichem Solutol-Gehalt wurden WAXD- und SAXD-Messungen angeschlossen, um festzustellen, in welcher Modifikation die erstarrten SLN vorliegen.

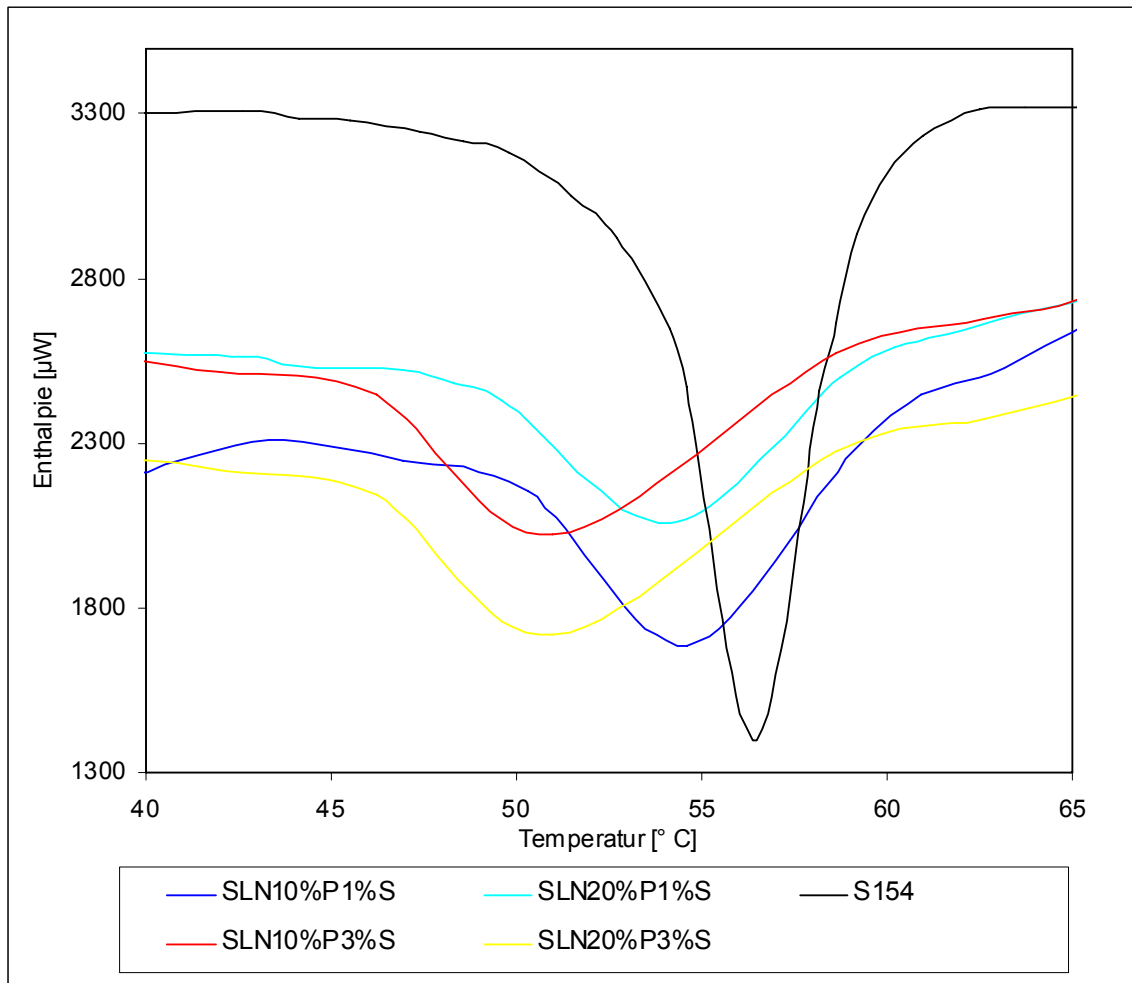


Abb. 4.29: Überlagerung von DSC-Thermogrammen von SLN-Dispersionen mit 10 bzw. 20 % P90H in der LM und mit 1 bzw. 3 % Solutol im Vergleich zu S154-Bulkmaterial nach einmonatiger Lagerzeit.

4.5.3.3 WAXD-Untersuchungen

Die SLN zeigten in Röntgenweitwinkeluntersuchungen über einen Lagerzeitraum von 3 Monaten keine Veränderungen der Netzebenenabstände und somit der Modifikation. Im Vergleich zur untersuchten LM, die erst nach einem Monat eine β -Modifikation ausbildete, war in den Nanosuspensionen die stabile β -Modifikation schon nach einem Tag nachweisbar. Die Netzebenenabstände behielten von da an konstante Werte (0,37, 0,41, 0,43 und 0,46 nm) (s. Tabelle 4.4). In Abb. 4.30 ist ein WAXD-Diffraktogramm einer Nanosuspension mit 20 % P90H in der LM und 3 % Emulgator dargestellt. Der große Halo zwischen 25 und 35° 2θ ist auf den großen Wasseranteil im System zurückzuführen, wie eine Vergleichsmessung mit reinem Wasser zeigte. Der geringe Feststoffanteil von 5 % LM führte zu einer niedrigeren Intensität der Interferenzen, die dem Halo als kleine Spitzen aufgelagert

und dem Hartfett zuzuordnen sind. Die SLN mit unterschiedlichem Emulgator- und LM-Anteil zeigten über die gesamten drei Monate keine Unterschiede in den Diffraktogrammen.



Abb. 4.30: WAXD-Diffraktogramm von SLN mit 20 % P90H in der LM und 3 % Solutol nach einer Lagerzeit von 3 Monaten.

Tabelle 4.4: WAXD: Netzebenenabstände [nm] der SLN mit 10 bzw. 20 % P90H und 1 bzw. 3 % Solutol, einen Tag und 3 Monate nach der Herstellung betrachtet.

	1 Tag nach Herstellung		3 Monate nach Herstellung	
	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]
SLN 10%P90H 1 % Sol.	24,0	0,37	24,1	0,37
	21,8	0,41	21,7	0,41
	20,7	0,43	20,6	0,43
	19,5	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H 1 % Sol.	24,2	0,37	24,1	0,37
	21,8	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,7	0,43
	19,4	0,46	19,3	0,46
SLN 10%P90H 3 % Sol.	24,0	0,37	24,0	0,37
	21,8	0,41	21,7	0,41
	20,7	0,43	20,5	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H 3 % Sol.	24,2	0,37	23,9	0,37
	21,8	0,41	21,6	0,41
	20,7	0,43	20,5	0,43
	19,4	0,46	19,2	0,46

In der Folge wurden mit SAXD-Untersuchungen SLN-Dispersionen mit 1 bzw. 3 % Solutol in Bezug auf die Netzebenenabstände im Fernordnungsbereich miteinander verglichen.

4.5.3.4 SAXD-Untersuchungen

SLN-Dispersionen mit 3 % Solutol in der Formulierung zeigten eine Aufweitung der Netzebenenabstände im Vergleich zu S154-Bulk (4,4 nm) (s. Abb. 4.31). Diese Erweiterung der Netzebenenabstände reduzierte sich jedoch mit längerer Lagerung von drei Monaten bei SLN mit 10 bzw. 20 % P90H in der LM von etwa 4,8 bzw. 4,9 auf ca. 4,6 nm. Im Vergleich zur LM bewirkte das Lecithin keine so starke Aufweitung der Netzebenen (s. 4.1.7). Die Standardformulierung mit 1 % Solutol konnte über den gezeigten Zeitraum keine signifikante Aufweitung der Netzebenen gegenüber dem S154-Bulkmaterial zeigen.

Neben einer Variation der Emulgatorkonzentration wurde des Weiteren eine Variation der Homogenisationsdauer durchgeführt.

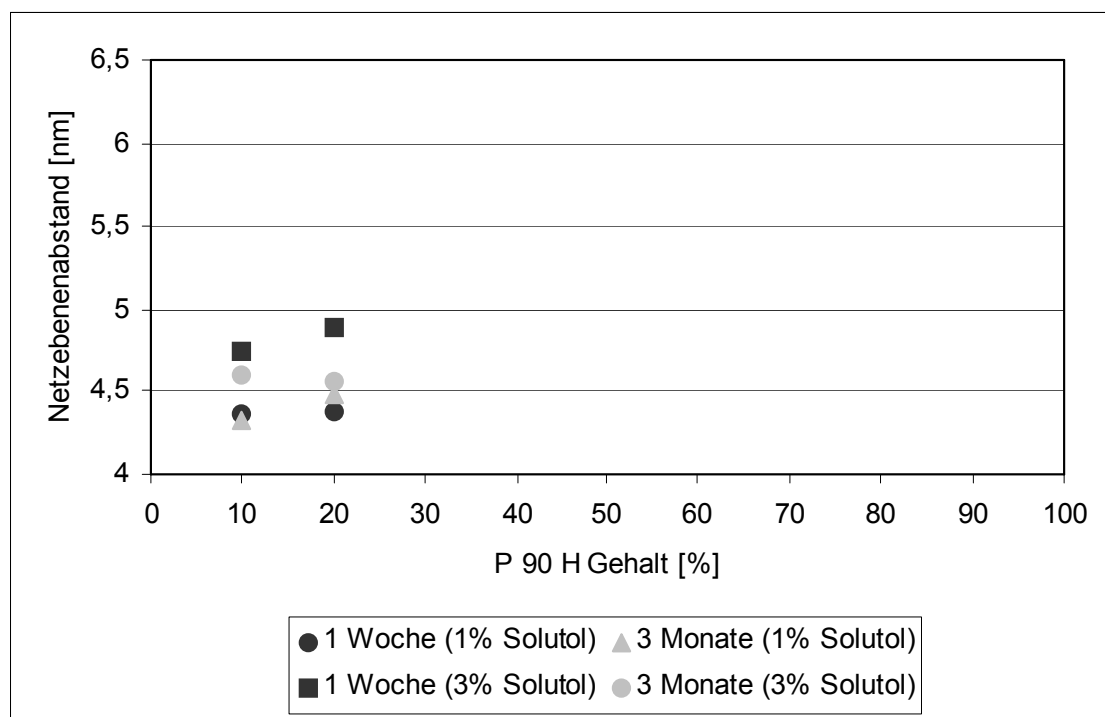


Abb. 4.31: Netzebenenabstände der SLN mit 10 bzw. 20 % P90H und 1 bzw. 3 % Solutol eine Woche bzw. 3 Monate nach der Herstellung im Vergleich.

4.5.4 Variation der Homogenisationsdauer

Bei der Hochdruckhomogenisation wird das eingesetzte Probenvolumen zyklweise homogenisiert. Die Herstellungsdauer wurde über eine Veränderung der standardmäßigen Zyklenzahl von 20 verringert (15 Zyklen) bzw. erhöht (25 Zyklen). Die Partikel wurden in erster Linie in Hinblick auf ihre Partikelgrößenveränderung und Fettsäure- und Phospholipid-Zusammensetzung untersucht. Des Weiteren wurden zur Betrachtung der Kristallstruktur Röntgenuntersuchungen gemacht.

4.5.4.1 Partikelgrößenbestimmung

Eine Variation der Zyklenzahl bewirkte bei der Formulierung mit 10 % P90H in der LM kaum merkliche Partikelgrößenveränderungen (s. Abb. 4.32). Die SLN waren nach 15 Zyklen in demselben Größenordnungsbereich wie nach 20 Zyklen. Einzig der Polydispersitätsindex lag nach 15 Zyklen deutlich höher als nach 20. Eine Verlängerung der Homogenisierungsdauer (25 Zyklen) bewirkte bei dieser SLN-Rezeptur zwar eine weitere Verkleinerung des Polydispersitätsindex und eine leichte Partikelgrößenverkleinerung, jedoch eine größere Standardabweichung. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen hatte in der Rezeptur mit 20 % P90H in der LM eine Erhöhung der Zyklenzahl auf 25 keine Verkleinerung der Partikel zur Folge. Es kam hierbei zu einem drastischen Anstieg der Partikelgröße bei ebenfalls zunehmender Polydispersität der Partikel. 20 Zyklen waren auch in diesem Fall als optimal anzusehen, da die Partikelgrößenverteilung im Vergleich zu der bei einer Herstellungsdauer von 15 Zyklen noch einmal gesenkt werden konnte. Die Partikelgröße nach 15 bzw. 20 Zyklen unterschied sich zudem kaum.

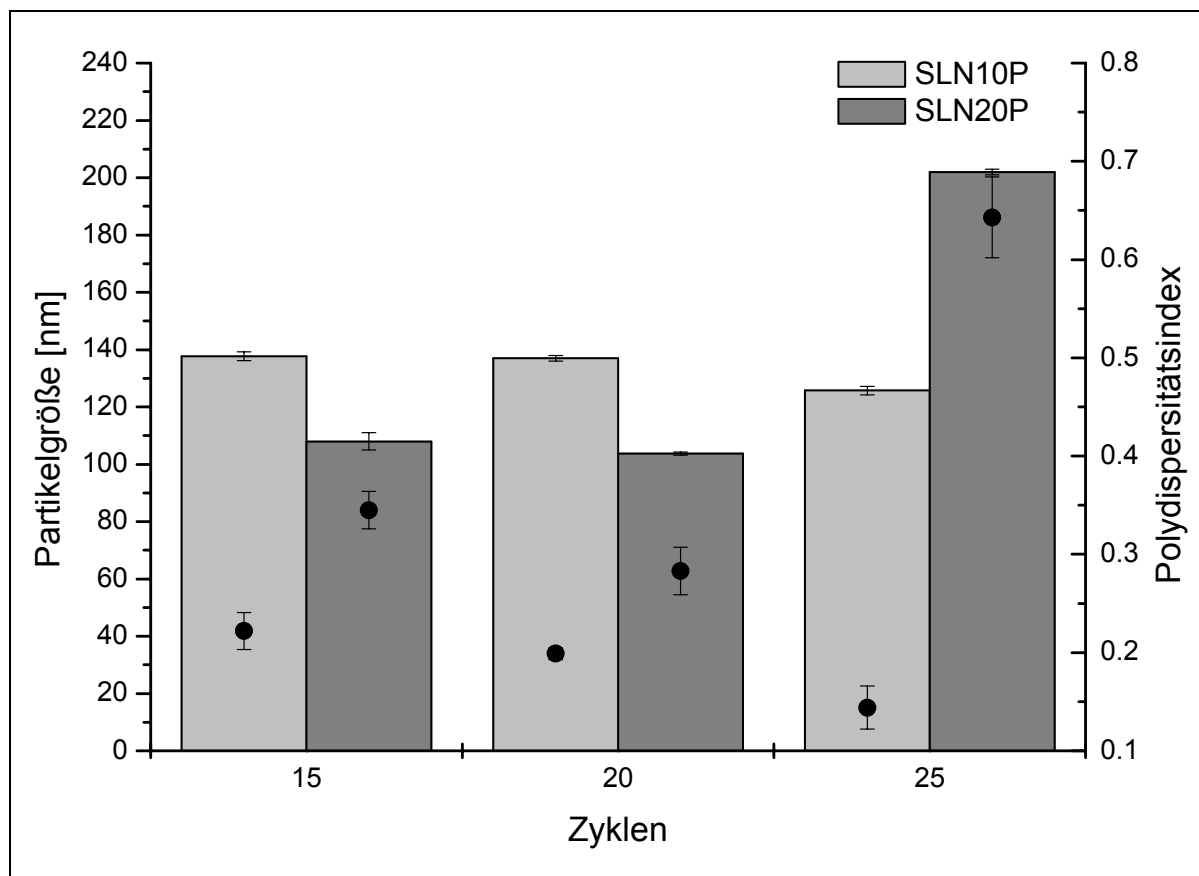


Abb. 4.32: PCS-Bestimmung der Standardformulierung mit 10 bzw. 20 % P90H in der S154-LM bei einem Solutol-Gehalt von 1 %. Die Zyklenzahl wurde bei 15, 20 und 25 gewählt. Die angegebenen Messungen erfolgten eine Woche nach der Herstellung, n=4.

Die Ergebnisse aus Abb. 4.32 haben gezeigt, dass sich 20 Zyklen als optimale Herstellungsdauer herausstellten.

4.5.4.2 WAXD-Untersuchungen

Mit Hilfe von WAXD wurde überprüft, ob die Veränderung der Homogenisationszeit Auswirkungen auf die Kristallstruktur der SLN hat. In Tabelle 4.5 sind die charakteristischen Interferenzen über ihre Position 2 Theta [°] und den daraus resultierenden Netzebenenabstand [nm] angegeben. Im Vergleich zur Standardformulierung, die 20 Zyklen lang homogenisiert wurde, war bei allen Proben die gleiche Nahordnung bei 0,37, 0,41, 0,43 und 0,46 nm zu finden. Diese Netzebenenabstände veränderten sich über den gesamten betrachteten Lagerzeitraum nicht. Diese Reflexe sind, wie schon in Kapitel 4.5.3.3 beschrieben, ein Beweis für eine in den Nanosuspensionen spontan erfolgende Ausbildung der stabilen β -Modifikation.

Tabelle 4.5: WAXD-Untersuchungen der SLN-Standardformulierung mit 1 % Solutol und 10 bzw. 20 % P90H unter Variation der Zyklenanzahl (15, 25) einen Tag bzw. einen Monat nach der Herstellung.

	1 Tag nach Herstellung		1 Monat nach Herstellung	
	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]	Pos. [°2Th.]	Netzebenenabstand [nm]
SLN 10%P90H 15 Zyklen	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H 15 Zyklen.	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 10%P90H 20 Zyklen	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,2	0,46
SLN 20%P90H 20 Zyklen	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 10%P90H 25 Zyklen	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,4	0,46
SLN 20%P90H 25 Zyklen	24,1	0,37	24,1	0,37
	21,7	0,41	21,7	0,41
	20,6	0,43	20,6	0,43
	19,4	0,46	19,3	0,46

Die Homogenisierungsdauer von 20 Zyklen stellt für das zu homogenisierende Gut eine hohe thermische Belastung dar. Um den Einfluss der Zyklendauer auf die Phospholipid-Zusammensetzung bzw. den PC- und LPC-Gehaltes zu testen, wurden ³¹P-NMR-Bestimmungen mit den in Abb. 4.32 betrachteten Nanosuspensionen durchgeführt. Stellvertretend für diese Dispersionen wurde eine SLN-Zubereitung, die unter maximaler thermischer Belastung hergestellt wurde (25 Zyklen), einer GC/MS-Messung zur Überprüfung der Fettsäure-Zusammensetzung unterworfen. Diese Zubereitung enthielt 20 % P90H in der LM.

4.5.4.3 Bestimmung der Phospholipid-Zusammensetzung

P90H ist ein Phospholipid, das mind. 90 % hydriertes Phosphatidylcholin (PC) und maximal 4 % hydriertes Lysophosphatidylcholin (LPC) enthält. Die Ergebnisse der ^{31}P -NMR-Analyse der betrachteten Nanosuspensionen sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Es wurden die unterschiedlich lang homogenisierten Zubereitungen in ihrem PC- bzw. LPC-Gehalt verglichen. Es spielte dabei keine Rolle, bei welcher Anzahl an Zyklen die Zubereitungen hergestellt wurden, sie blieben im geforderten PC- bzw. LPC-Toleranzbereich.

Tabelle 4.6: Bestimmung der PC- und LPC-Konzentration per ^{31}P -NMR von SLN-Standardformulierungen bei unterschiedlicher Zyklenanzahl (15, 20 und 25).

Gehalt P90H in LM [%]	Zyklen HDH	PC Anteil von PC-LPC-Gesamtmenge [%]	LPC Anteil von PC-LPC-Gesamtmenge [%]	PC Anteil von P90H-Gesamtmenge [%]	LPC Anteil von P90H-Gesamtmenge [%]
10	15	96,76	3,24	> 90,0	< 4,0
10	20	98,69	1,31	> 90,0	< 4,0
10	25	96,34	3,66	> 90,0	< 4,0
20	15	94,30	5,70	> 90,0	< 4,0
20	20	93,78	6,22	> 90,0	< 4,0
20	25	95,33	4,67	> 90,0	< 4,0

4.5.4.4 Fettsäure-Zusammensetzung

Eine Bestimmung der Fettsäure-Zusammensetzung wurde über eine GC/MS-Analytik durchgeführt. Laut Herstellerangaben sind mind. 98 % gesättigte Fettsäuren im P90H enthalten. Als Probe wurde eine Zubereitung gewählt, die 25 Zyklen homogenisiert wurde. Die nach Trennung von 100 μL Probenvolumen über GC erhaltenen Fraktionen wurden per Massenspektrogramm ausgewertet (s. Abb. 4.33). Eine Signalzuordnung der Peaks zu den entsprechenden Fettsäuren ist in Tabelle 4.7 unternommen worden.

Die Auswertungen aus Tabelle 4.7 zeigen, dass keinerlei ungesättigte Fettsäureverbindungen in der Probe zu finden waren. Die Probe enthielt hydrierte Rizinolsäure, welche Bestandteil des Emulgators Solutol HS 15 ist. Der Anteil an Stearin- und Palmitinsäure in P90H muss laut Herstellerangaben mind. 98 % betragen, in S154 sind ungefähr 96 % an Palmitin- und Stearinsäure im Verhältnis 1:1 enthalten. Summiert man den Anteil dieser beiden Säuren der Tabelle 4.7, so errechnet sich ein Prozentsatz von 96,5 % vom gesamten Probenvolumen (inkl. Glycerol und Solutol). Der prozentuale Anteil der beiden Fettsäuren im Vergleich zum Gesamtanteil an Fettsäuren ohne Glycerol und hydrierte Rizinolsäure liegt damit bei 98,2 %, was sowohl den Anforderungen von P90H als auch S154 entspricht. Eine genaue Auftrennung, inwiefern sich die Fettsäuren auf das Hartfett bzw. das Phospholipid aufteilen, ist nicht möglich.

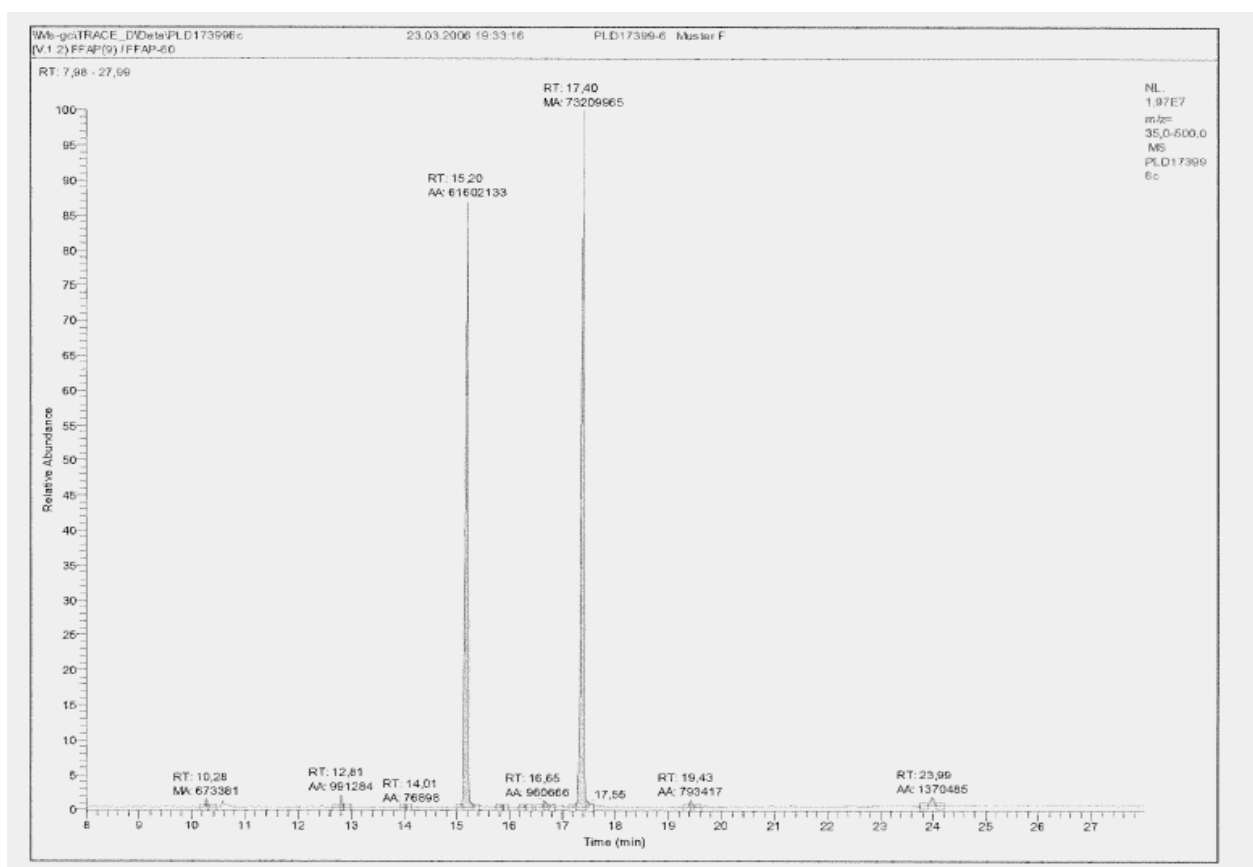


Abb. 4.33: GC/MS-Spektrum einer Probe (Homogenisierdauer 25 Zyklen). Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen bzw. die Retentionszeit.

Tabelle 4.7: Signalzuordnung, Sättigungsgrad und relative Mengen [%] der Fettsäuren bzw. Fettsäuremethylester.

Refraktär-zeit [Min]	Probenbestandteile	Sättigungs-grad	Relative Menge [%]
10,28	Dodecansäuremethylester	12:0	0,4
12,81	Tetradecansäuremethylester	14:0	0,6
14,01	Pentadecansäuremethylester	15:0	0,1
15,20	Hexadecansäuremethylester	16:0	44,1
16,29	Heptadecansäuremethylester	17:0	0,1
16,65	Glycerol	-	0,7
17,40	Octadecansäuremethylester	18:0	52,4
19,43	Eicosansäuremethylester	20:0	0,6
23,99	12-OH-Octadecansäuremethylester	18:0 OH	1,0

Diese Reinheitsprüfung hat ergeben, dass selbst bei Herstellung der Nanosuspensionen unter hoher thermischer Belastung keine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung unter das geforderte Maß stattfindet. Da die untersuchte Probe unter maximaler thermischer Belastung homogenisiert wurde, können die erhaltenen Ergebnisse auf alle in diesem Kapitel betrachteten Proben übertragen werden.

Die Zyklenzahl war nur ein Parameter, um eine Variation der SLN-Herstellung vorzunehmen. Im nächsten Abschnitt wurden unterschiedliche LM-Konzentrationen eingesetzt. Die Solutol-Konzentration blieb in einer Serie konstant bei 1 %, wohingegen sie in anderen Fällen immer ein Fünftel des LM-Massenanteils betrug. Die Untersuchungen der variierten LM-Anteile bei einem LM-Solutol-Verhältnis von 5:1 (m/m) wurden in der Folge behandelt.

4.5.5 Variation des LM-Anteiles (LM-Solutol 5:1)

In Tabelle 4.8 wurde eine Gegenüberstellung des P90H-Gehaltes in den entsprechenden LM vorgenommen. Die mit instabil gekennzeichneten Systeme rahmten nach der Herstellung auf und trennten sich in der Folge in zwei Phasen. Diese Zubereitungen wurden nicht weiter untersucht.

Tabelle 4.8: Aussage über die Stabilität von Nanosuspensionen bei Variation des LM-Anteiles bzw. des P90H-Gehaltes in der LM. Das LM-Solutol-Verhältnis beträgt 5:1 (in Klammern: effektive Solutol-Konzentration in der Dispersion).

	7,5 % LM (1,5 % Solutol)	10 % LM (2 % Solutol)	15 % LM (3 % Solutol)
10 % P90H	SLN	SLN	<i>instabil</i>
20 % P90H	SLN	SLN	<i>instabil</i>
30 % P90H	<i>instabil</i>	<i>instabil</i>	<i>instabil</i>

4.5.5.1 Partikelgrößenbestimmung

Es konnten nur die SLN mit einem P90H-Gehalt von 10 bzw. 20 % in der LM bei einem LM-Gehalt von 7,5 bzw. 10 % als Nanosuspensionen hergestellt werden. Die SLN, die 10 % P90H enthielten, zeigten nach zweimonatiger Lagerung einen hydrodynamischen Durchmesser im Bereich von 150 bis 160 nm (s. Abb. 4.34). Der Polydispersitätsindex lag bei diesen Formulierungen bei ca. 0,2-0,22 mit einer geringen Standardabweichung. Bei einem Gehalt von 20 % P90H in der LM erhielt man bei einem LM-Gehalt von 10 % Partikel in einer Größenordnung von 140 nm. Diese wiesen jedoch einen PI von mehr als 0,4 auf und müssen daher als polydispers bezeichnet werden. Ein noch schlechteres Ergebnis erhielt man, wenn der LM-Anteil bei 7,5 % lag. Hier entstanden Partikel, die einen Durchmesser von ca. 230 nm bei einem PI von ungefähr 0,9 besaßen. Die letzten beiden besprochenen Nanosuspensionen konnten die Mindestanforderungen an SLN mit einer engen Partikelgrößenverteilung von unter 0,3 nicht einhalten.

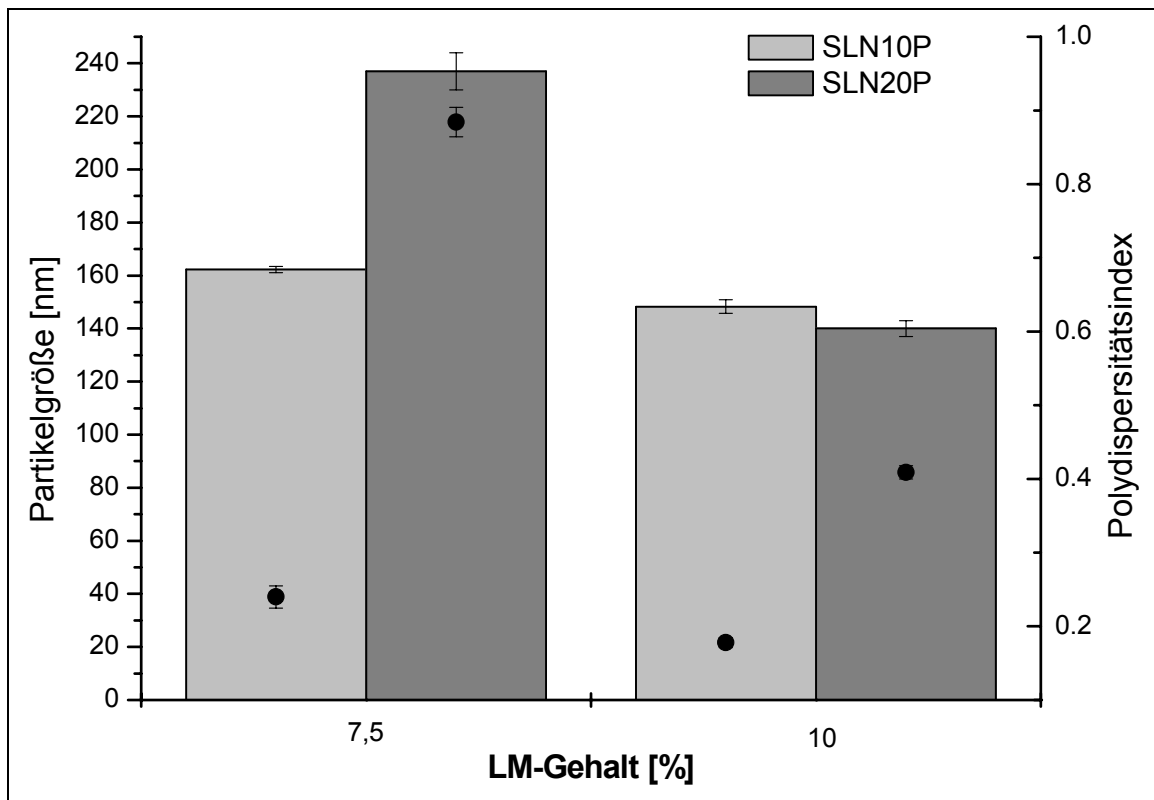


Abb. 4.34: PCS-Bestimmung der SLN mit 10 bzw. 20 % P90H in der S154-LM (7,5 bzw. 10 %) bei einem LM-Solutol-Verhältnis von 5:1. Die angegebenen Messungen erfolgten zwei Monate nach der Herstellung, n=4.

Da die Partikelgröße der im LM-Anteil variierten SLN keine Verbesserung gegenüber der Standardformulierung ergab, wurden diese Zubereitungen nicht weiter berücksichtigt. Eine Variation des LM-Gehaltes beinhaltet bei den folgenden Untersuchungen einen konstanten Solutol-Gehalt von 1 %.

4.5.6 Variation des LM-Anteiles (Solutol-Gehalt 1 %)

Der in Tabelle 4.9 aufgeführten Gegenüberstellung des P90H-Gehaltes bei unterschiedlichem LM-Gesamtanteil ist zu entnehmen, dass bei bestimmten Variationen der Zusammensetzung halbfeste Systeme erhalten wurden. Betrachtete man diese Rezepturen im Einzelnen, so konnte herausgearbeitet werden, dass das Verhältnis zwischen Hartfett und Solutol > 6:1 war. Setzte man demzufolge weniger als ein Sechstel des Stabilisators ein, entstanden halbfeste Systeme.

Tabelle 4.9: Aussage über die Beschaffenheit von Nanosuspensionen bei Variation des LM-Anteiles bzw. des P90H-Gehaltes in der LM. Die Solutol-Konzentration beträgt 1 %. Die Standardformulierungen sind hellgrau hinterlegt und zusätzlich kursiv gedruckt (in Klammern: S154/Solutol-Verhältnis).

	5 % LM (S154/Solutol)	7,5 % LM (S154/Solutol)	15 % LM (S154/Solutol)
10 % P90H	<i>SLN</i> (4,5:1)	<i>halbfest</i> (6,75:1)	<i>halbfest</i> (13,5:1)
20 % P90H	<i>SLN</i> (4:1)	<i>SLN</i> (6:1)	<i>halbfest</i> (12:1)
30 % P90H	<i>SLN</i> (3,5:1)	<i>SLN</i> (5,25:1)	<i>halbfest</i> (10,5:1)

4.5.6.1 Partikelgrößenbestimmung

Die SLN der Standardformulierung wurden bereits im oberen Abschnitt im Hinblick auf ihre Partikelgröße untersucht. Abb. 4.35 zeigt die Ergebnisse von Nanosuspensionen der Tabelle 4.9, deren Partikelgrößen bisher noch nicht bestimmt wurden. Die Zubereitung mit 30 % P90H in der Lipidmatrix bei einem LM-Anteil von 7,5 % zeigte über den betrachteten Lagerzeitraum von 3 Monaten einen ausgeprägten Anstieg im Durchmesser und im PI. Diese Probe war somit über diesen Lagerzeitraum nicht ausreichend stabil.

Die Nanosuspension, die 30 % P90H in der Lipidmatrix bei einem fünfprozentigen LM-Anteil enthielten, zeigte schon einen Tag nach der Herstellung einen PI von mehr als 0,600. Aus diesen Ausführungen wird klar, dass eine Einarbeitung von 30 % P90H oder mehr in die LM nicht sinnvoll ist.

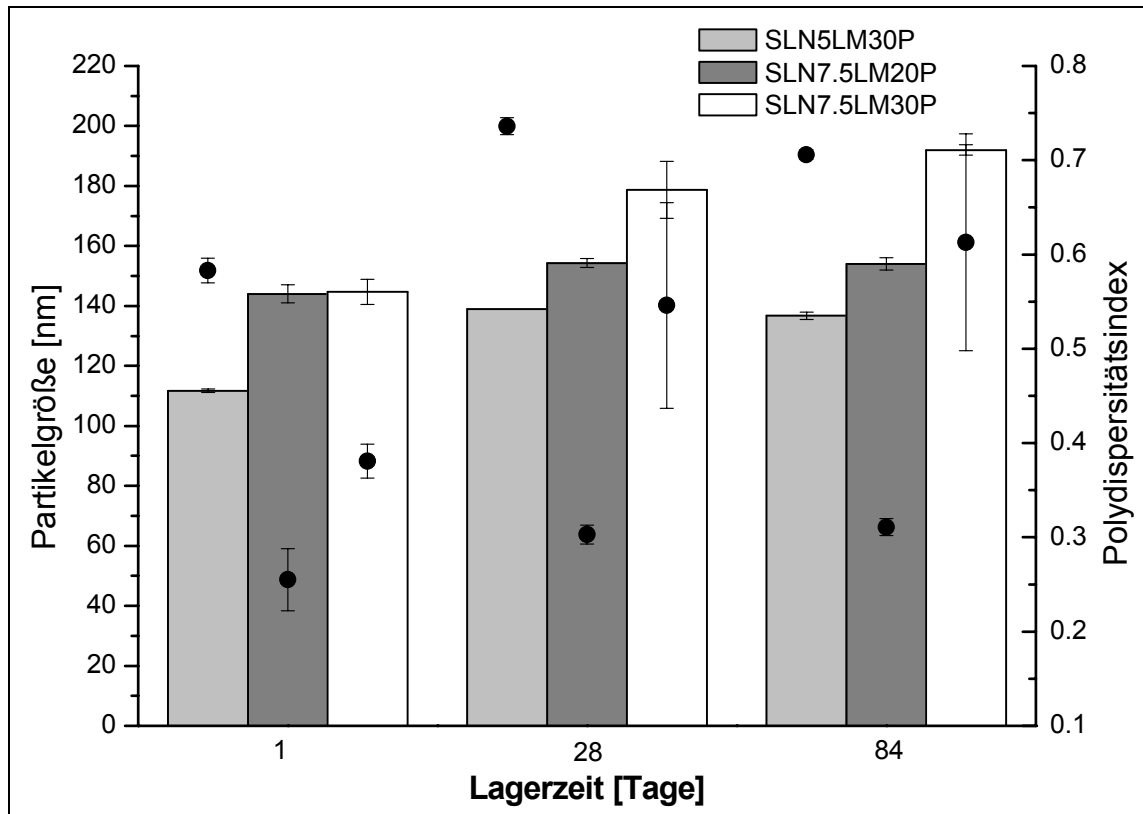


Abb. 4.35: PCS-Bestimmung der SLN mit 20 bzw. 30 % P90H in der S154-LM (5 bzw. 7,5 %) bei einer Solutol-Konzentration von 1 %, n=4.

Die SLN-Rezeptur, die 20 % P90H bei einem LM-Anteil von 7,5 % enthielt, zeigte über die betrachteten 3 Monate eine konstante Partikelgröße bei ca. 150 nm und einen PI von ungefähr 0,3. Diese Zubereitungen veränderten zwar ihre Partikelgröße nicht, jedoch ist der PI mit ca. 0,3 nicht als optimal anzusehen. Die betrachteten Zubereitungen zeigten gegenüber der Standardformulierung keine Vorteile.

In der Folge wurden zunächst TEM-Untersuchungen an den halbfesten Systemen durchgeführt, um eine visuelle Charakterisierung zu ermöglichen.

4.5.6.2 TEM-Untersuchungen an halbfesten Systemen

Bei einem Massenverhältnis von S154 zu Solutol von 6:1 erhielt man halbfeste Systeme. In Abb. 4.36 ist stellvertretend für alle halbfesten Systeme eine TEM-Aufnahme von einer Probe dargestellt, die 7,5 % LM bei 10 %igem P90H-Gehalt in der LM enthält. Es sind eindeutig nanopartikuläre Strukturen zu erkennen, die im Größenbereich von 150 nm liegen und damit zeigen, dass die halbfesten Systeme hochkonzentrierte Dispersionen von Nanopartikeln sind. Individuelle SLN waren bei allen anderen halbfesten Proben ebenfalls zu finden. Eine Redispergierung dieser

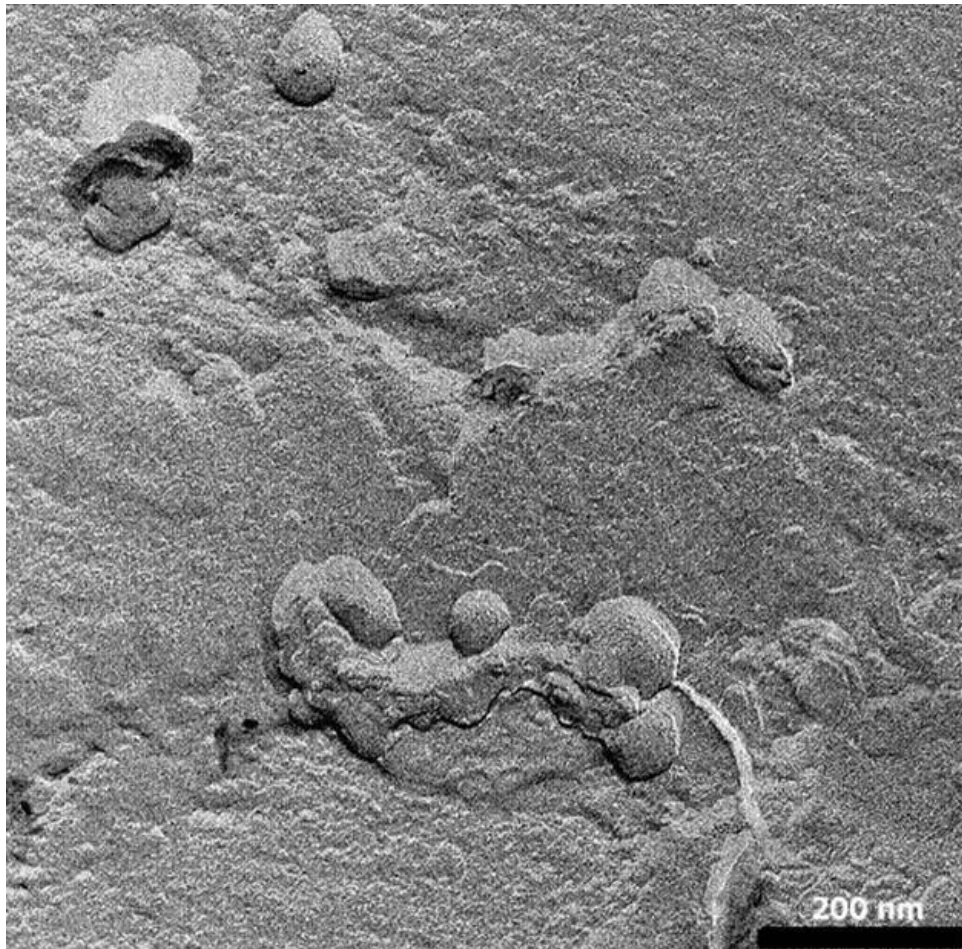


Abb. 4.36: TEM-Aufnahme einer halbfesten SLN-Zubereitung mit einem LM-Gehalt von 7,5 % und 10 % P90H in der LM einen Monat nach der Herstellung. Die Zubereitung enthielt 1 % Solutol.

Tabelle 4.10: PCS-Bestimmung von redispergierten und beschallten halbfesten Zubereitungen, einen Monat nach der Herstellung, n=4.

Probe	z-Average [nm] ± Standardabw.	PI ± Standardabw.
SLN 7,5%LM 10%P90H 1%S	261 ±13	0,343 ±0,024
SLN 15%LM 10%P90H 1%S	423 ±10	0,428 ±0,034
SLN 15%LM 20%P90H 1%S	205 ±5	0,207 ±0,005
SLN 15%LM 30%P90H 1%S	228 ±13	0,234 ±0,013

Systeme in Wasser (1:50 Verdünnung), eine Beschallung im Ultraschallbad und eine Partikelgrößenbestimmung konnten beweisen, dass eine Redispergierung zu einer flüssigen SLN-Dispersion problemlos möglich war. Die Partikelgrößen lagen allerdings bei über 200 nm (s. Tabelle 4.10).

Westesen und Siekmann (1997) beschrieben eine Gelierung von nanopartikulären Strukturen aufgrund einer verminderten Beladung der Partikeloberfläche mit Emulgatormolekülen, was zu einer Agglomeration und einer damit verbundenen Gelbildung der Zubereitungen führte.

4.5.6.3 Rheologische Untersuchungen der halbfesten Systeme

Um das Fließverhalten der halbfesten Systeme zu überprüfen, wurden rheologische Untersuchungen vorgenommen. Alle Systeme wiesen dabei strukturviskoses Fließverhalten auf. Die Fließgrenze lag bei allen Systemen unter 10 Pa. In der folgenden Abb. 4.37 ist ein repräsentatives Rheogramm einer halbfesten Zubereitung dargestellt. Mit zunehmender Scherbeanspruchung kam es zu einer linear ansteigenden Schubspannung, entsprechend einer konstanten Viskosität, was einem plastischen Fließverhalten mit Bingham-Charakteristik ähnelt [Bauer et al. 2002]. Bei einer Scherbeanspruchung von 0,0001 1/s, die als niedrigst mögliche Beanspruchung vorgegeben wurde, war die Fließgrenze erreicht. In Abb. 4.38 ist das zum Rheogramm aus Abb. 4.37 zugehörige Viskosigramm dargestellt. Da das Fließverhalten der halbfesten SLN-Zubereitung dem rheologischen Verhalten einer Bingham-Charakteristik ähnelte, wurde mit Hilfe von Gl. 3 die Viskosität des Systems bestimmt [Martin 2003].

$$\eta_B = \frac{T - T_0}{D} \quad \text{Gl. 3}$$

Mit zunehmender Scherbeanspruchung nahm die Viskosität von ca. 10000 Pas auf einen Wert von ungefähr 4500 Pas ab. Die Viskosität verringerte sich demnach mit steigender Schubspannung und blieb nicht konstant. Die vorherrschend kugeligen Nanopartikel verhielten sich nach Überwinden der Fließgrenze nicht wie ein idealviskos fließendes System. Lippacher et al. (2004) beschrieben halbfeste nanopartikuläre Systeme mit thixotropem Fließverhalten. Phospholipid-stabilisierte Tripalmitin-Nanosuspensionen verhielten sich nach Westesen und Siekmann (1997) wie halbfeste, salbenartige Gele. Die Gelbildung wurde der anisometrischen (plättchenartigen), kolloidalen Struktur der Nanopartikel zugeschrieben.

Die Untersuchungen an den halbfesten Systemen schlossen die Variation und Charakterisierung der SLN-Formulierungen ab. Im nächsten Abschnitt sollten unkonservierte SLN auf ihre Sterilisierbarkeit überprüft werden.

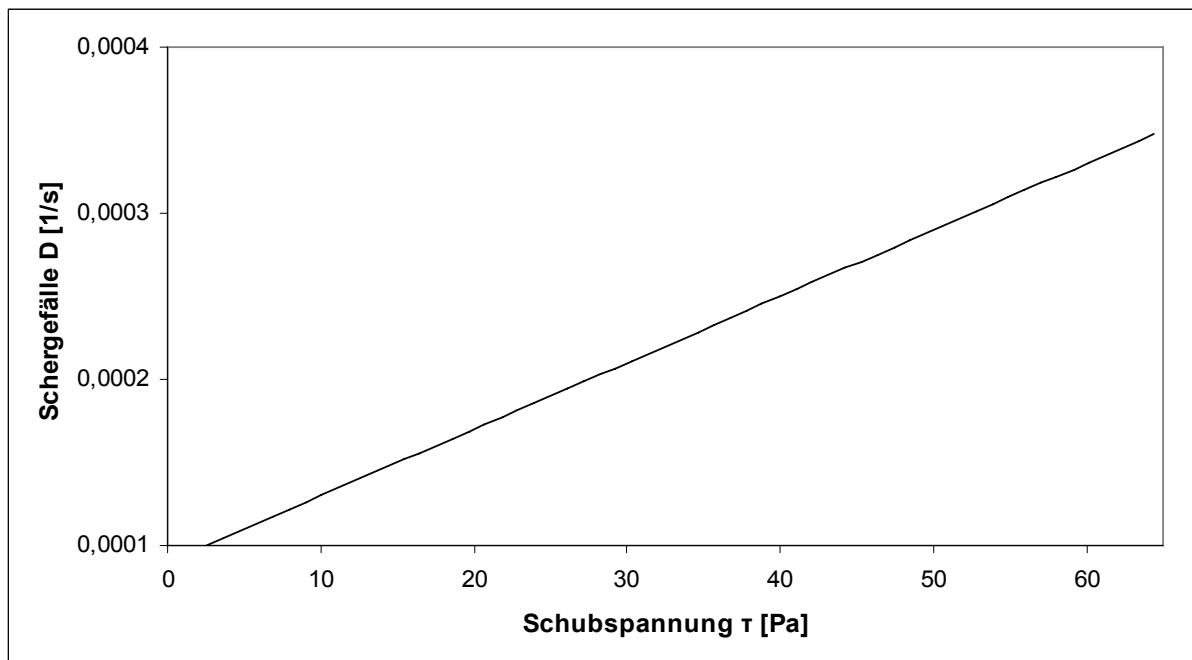


Abb. 4.37: Rheogramm einer makroskopischen halbfesten Zubereitung mit 7,5 % LM (10 % P90H in der LM) und einem Solutol-Gehalt von 1 %.

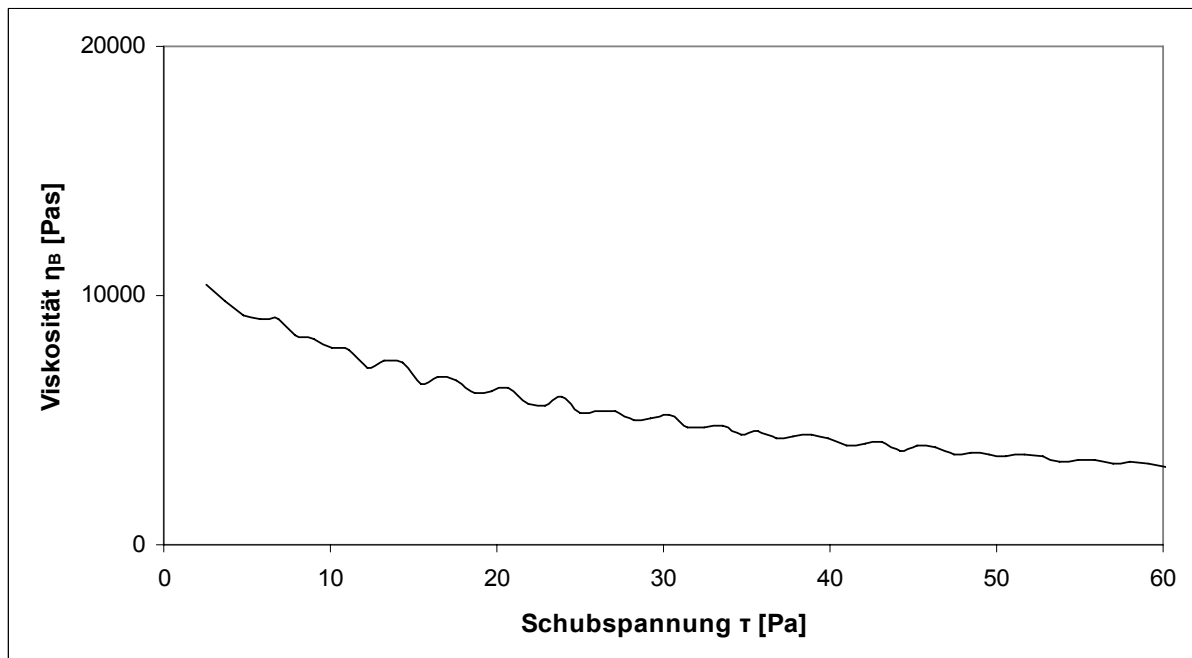


Abb. 4.38: Viskosigramm einer makroskopischen halbfesten Zubereitung mit 7,5 % LM (10 % P90H in der LM) und einem Solutol-Gehalt von 1 %. Die Viskosität η_B wurde nach Gl. 3 unter Berücksichtigung einer Fließgrenze von 2,6 Pa berechnet.

4.5.6.4 Zusammenfassende Diskussion zu den Untersuchungen von SLN-Variationen

Im Kapitel 4.5 wurde eine Charakterisierung von SLN-Variationen der Standardformulierung aus Kapitel 4.4 vorgenommen. Neben einer Variation des Homogenisators bei der Herstellung wurden zudem noch Veränderungen innerhalb der Herstellungsdauer, der Emulgatorkonzentration, der Konservierungsmittel, aber auch des LM-Anteils vorgenommen.

Eine Veränderung der Herstellungsweise unter Anwendung eines anderen Hochdruckhomogenisators (APV-2000) führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse der standardmäßigen Herstellung (Avestin Emulsiflex). Mit dem APV-2000 war ein Mindestprobenvolumen von 100 mL erforderlich, was in der Rezepturfindung einen großen Materialbedarf erforderlich macht. Der Emulsiflex erlaubte bei einem Mindestvolumen von ca. 10 mL eine viel höhere Zahl an Vorversuchen mit Chargenkonformität aller Rezepturbestandteile, was auch Liedtke et al. (2000) als positive Eigenschaft des Emulsiflex beschrieben. Da die Handhabung des Avestin Emulsiflex weitaus einfacher war als die des APV-2000, wurden alle Rezepturen mit dem Emulsiflex hergestellt.

Um das quecksilberhaltige Konservierungsmittel Thiomersal (0,005 %) aus der Standardrezeptur zu ersetzen, wurde nach einer Alternative gesucht. Mit PCS-Messungen konnte jedoch festgestellt werden, dass die eingesetzten Konservierungsmittel zu einer Zunahme der Partikelgröße und zu einer Polydispersität der Partikel führten. Der Grund könnte darin bestehen, dass die Konservierungsmittel-Alternativen teilweise in einer 10- bis 100-fach höheren Konzentration eingesetzt werden müssen, um Wirkungsbereich und die minimale Hemmkonzentration zu erreichen (s. Tabelle 3.2). In höheren Konzentrationsbereichen verhielten sich diese Hilfsstoffe in der Rezeptur nicht inert, so dass es zu einer Agglomeration bzw. sogar zum Bruch der Nanoemulsion kam. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse, die mit allen Konservierungsmittel-Alternativen erhalten wurden, erwies sich Thiomersal als das Konservierungsmittel der Wahl. Aufgrund der geringen Wirkkonzentration sind cytotoxische Einflüsse beispielsweise auf peritoneale Makrophagen bisher nicht beschrieben worden [Schöler et al. 2000]. Eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration von 1 % auf 3 % (m/m) führte aufgrund der besseren Stabilisierung der Grenzflächen zu einer Partikelgrößenverkleinerung, jedoch sollte in Hinblick auf eine parenterale Anwendung eine möglichst geringe

Emulgatorkonzentration eingesetzt werden, um eine Toxizität der Bestandteile so gering wie möglich zu halten. Schöler et al. deuteten in ihren Studien an, dass zwar die Emulgatorkonzentration, aber beispielsweise nicht die Partikelgröße der SLN-Dispersionen einen Einfluss auf die Viabilität und Cytokin-Produktion von Makrophagen besitzen soll [Schöler et al. 2001]. Die thermische Analyse der Standardformulierung zeigte im Vergleich zu SLN-Dispersionen mit höherem Emulgatorgehalt Unterschiede, die wahrscheinlich ausschließlich auf den Partikelgrößenunterschied der einzelnen SLN-Dispersionen zurückgeführt werden können. Es kam bei allen untersuchten SLN-Rezepturen zu einer Schmelzpunktdepression der LM im Vergleich zum Bulkmaterial, die bei einem Partikelgrößenunterschied von >50 nm eindeutig detektiert werden konnte. Dies ist einzig auf die enorme Oberflächenvergrößerung der Nanopartikel zurückzuführen, was einen niedrigeren Schmelzübergang der SLN zum Bulkmaterial zur Folge hatte [Westesen et al. 1997].

Eine Variation der Zyklendauer brachte das Ergebnis, dass eine Erhöhung des Energieeintrags (25 Zyklen) nicht mit einer Partikelverkleinerung einherging. Vielmehr wurden die Partikel mit verlängerter Homogenisationsdauer größer und polydispers verteilt, was anscheinend auf einen zu hohen Energieeintrag hindeutet. Auf diese Art und Weise kam es möglicherweise zu einer Adhäsion der Partikel, die zu einer Agglomeration oder gar Aggregation weiter verlaufen könnte. 20 Zyklen erwiesen sich für die Herstellung der SLN-Formulierungen als optimal. Die chemische Stabilität der Rezepturbestandteile war sogar bei längerer Zyklenzahl gegeben, da sich sowohl der Fettsäuregehalt als auch die Phospholipidzusammensetzung innerhalb der Spezifikationsgrenzen des Herstellers bewegten [Phospholipid GmbH 1997].

Bei allen SLN-Formulierungen, sowohl bei der Standardrezeptur als auch bei den Variationen, stellte sich bei WAXD-Untersuchungen spontan nach der Herstellung die stabile β -Modifikation ein. Bei den Untersuchungen der DMPC-haltigen LM war hingegen die stabile Modifikation erst einen Monat nach der Herstellung und bei DMPC-freien LM sogar erst drei Monate nach der Herstellung nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für die spontane Ausbildung der stabilen β -Modifikation liegt möglicherweise im partikulären Charakter der SLN-Dispersionen, da eine Modifikationsänderung unter den bei der Hochdruckhomogenisation vorherrschenden Bedingungen in vielen Bereichen der Nanosuspension beginnen und schneller weitergetragen werden kann, als dies im Bulkmaterial der Fall ist. Die

Ausbildung der stabilen β -Modifikation erfolgt in den SLN-Dispersionen somit spontan, was in der LM nicht der Fall ist. Attama und Müller-Goymann (2007) konnten diese Beobachtungen bei SLN-Dispersionen auf Bienenwachs- und P90G-Basis ebenfalls machen.

Eine Aufweitung der Netzebenenabstände, die bei SAXD-Untersuchungen der LM mit steigendem P90H-Gehalt beobachtet werden konnte, war bei den SLN-Dispersionen ebenfalls erkennbar, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei der LM aus P90H und S154. Ein möglicher Grund dafür ist eine Ausschleusung von P90H aus dem S154-Kristallgitter, welche während der Hochdruckhomogenisation verstärkt auftreten könnte beispielsweise in Form einer Anreicherung an der Grenzfläche der Partikel zur umgebenden wässrigen Phase [Schubert et al. 2006; Harms 2008].

Eine Variation der SLN-Standardformulierung, die 5 % LM enthielt, wurde mit einer Erhöhung des LM-Anteils auf 7,5, 10 und 15 % durchgeführt. Die fünfzehnprozentigen Systeme ergaben keine stabilen Nanosuspensionen und zeigten eine rasche Aufräumung kurz nach der Herstellung. SLN mit 7,5 und 10 % LM in der Formulierung lieferten nanopartikuläre Suspensionen, die jedoch im Vergleich zur Standardformulierung entweder vergrößerte Partikel oder breite Partikelgrößenverteilungen besaßen. Es war somit keine Verbesserung durch eine Erhöhung des LM-Anteils gegenüber der Standardformulierung erreichbar wie beispielsweise in den SLN-Dispersionen von Schubert, die 15 % P90G in der LM enthielten [Schubert et al. 2006].

Es wurde außerdem herausgearbeitet, dass das Verhältnis S154:Solutol nicht größer als 6:1 sein durfte, da ansonsten halbfeste Systeme mit partikulärem Charakter entstanden. Eine ausreichende Stabilisation der Nanosuspension konnte nur in Anwesenheit eines Mindestgehalts an Solutol erfolgen.

Da keine Alternative zu quecksilberhaltigen Konservierungsmitteln gefunden werden konnte, wurden in der Folge konservierungsmittelfreie SLN hergestellt und auf ihre mikrobiologische Qualität und Sterilisierbarkeit überprüft.

4.6 Untersuchungen an unkonservierten SLN-Dispersionen

Die SLN-Standardrezeptur wurde frei von Konservierungsmitteln und unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Zimmermann et al. beschrieben 1999 bereits eine aseptische Herstellungsmethode von pyrogenfreien SLN-Dispersionen. In der vorliegenden Arbeit war eine Sterilfiltration durch entsprechende Filter nicht möglich, da diese ausnahmslos verstopften. Eine Autoklavierung der SLN ging mit einer Koaleszenz der Nanoemulsionstropfen einher, was zu einer Vergrößerung der Partikel und ihrer Verteilung führte.

Mit den unkonservierten SLN wurden zunächst Steriltests durchgeführt.

4.6.1 Prüfung auf Sterilität

Nach 8 Tagen Inkubationszeit wurden die KBE auf dem jeweiligen Nähragar (Anaerobier bzw. Hefen und Pilze) bestimmt. Die unkonservierten Nano-suspensionen zeigten sowohl unmittelbar nach der Herstellung als auch über eine Lagerzeit von einem halben Jahr keinerlei Verkeimung. Es konnten weder Anaerobier noch Hefen und Pilze in der Formulierung gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Autosterilität hin, die die Herstellungsart der Hochdruckhomogenisation oberhalb der Schmelztemperatur der Komponenten mit sich bringen könnte.

Im nächsten Kapitel wurde eine Möglichkeit der Entkeimung durch Mikrowelleneinwirkung an unkonservierten und mit *E. coli* kontaminierten SLN-Zubereitungen untersucht.

4.6.2 Mikrowellenbestrahlung zur Entkeimung von SLN

Die Ausgangskeimzahl vor Behandlung der Partikel in der Mikrowelle entsprach 300 KBE. Diese Keimzahl wurde in einer als Blindprobe definierten SLN-Dispersion bestimmt, die mit *E. coli* beimpft, jedoch nicht in der Mikrowelle behandelt worden war (s. Abb. 4.39). Eine Erhöhung der Wattzahl und eine Verlängerung der Einwirkdauer der Mikrowellen hatten einen positiven Einfluss auf die Keimabtötung zur Folge. Abb. 4.39 zeigt im logarithmischen Maßstab einen proportionalen Einfluss der Einwirkzeit und Wattzahl auf die KBE. Die Proben erfuhren bei allen angewandten Bedingungen eine leichte Erwärmung auf ca. 60 °C, weshalb außerdem der thermische Effekt auf die Partikelgröße untersucht wurde. Dazu wurden PCS-Messungen der Nanosuspensionen vor und nach der

Mikrowellenbestrahlung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.40 zusammengefasst. Die Partikelgrößen der mit Mikrowellen behandelten SLN zeigten im Vergleich zu einer nicht bestrahlten Formulierung keine signifikanten Partikelgrößenunterschiede (statistisch nachgewiesen, $\alpha=0,05$). In Abb. 4.40 sind die Partikelgrößen der Zubereitungen abgebildet, die bei 180 Watt für 15, 30 oder 45 Sekunden in der Mikrowelle bestrahlt worden sind. Es ist davon auszugehen, dass die Keimreduktion nicht nur durch die Mikrowelleneinwirkung zustande gekommen ist, sondern dass auch ein thermischer Effekt, der sich in einer Erhitzung der relativ kleinen Probenvolumina (5 mL) manifestierte, für eine Keimreduktion nicht auszuschließen ist. Darüber hinaus wurde mit unbestrahlten Proben ausgeschlossen, dass die Hilfsstoffe der Formulierung ein Keimwachstum hemmen. Ein Wachstum war innerhalb der Nanosuspension nahezu ungehindert möglich.

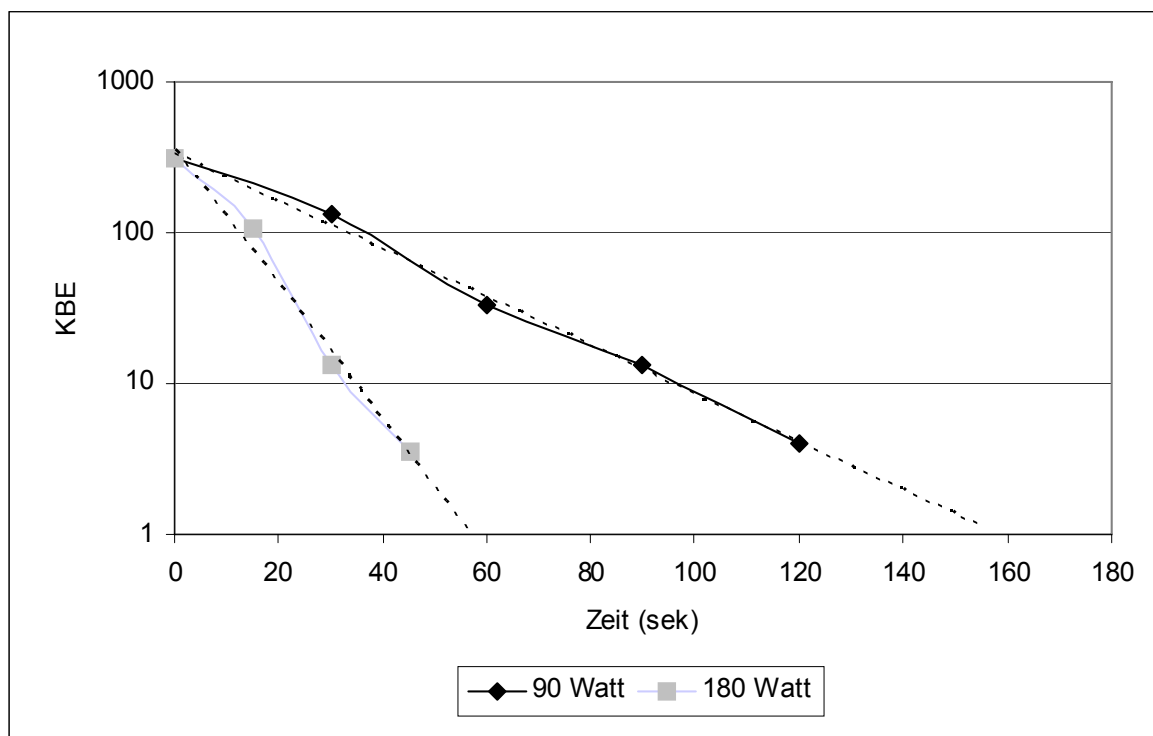


Abb. 4.39: Keimzahlbestimmung von mit *E. coli* beimpften SLN vor bzw. nach Behandlung in der Mikrowelle. Die keimbildenden Einheiten (KBE) sind logarithmisch gegen die Einwirkdauer aufgetragen (Bestgerade gestrichelt).

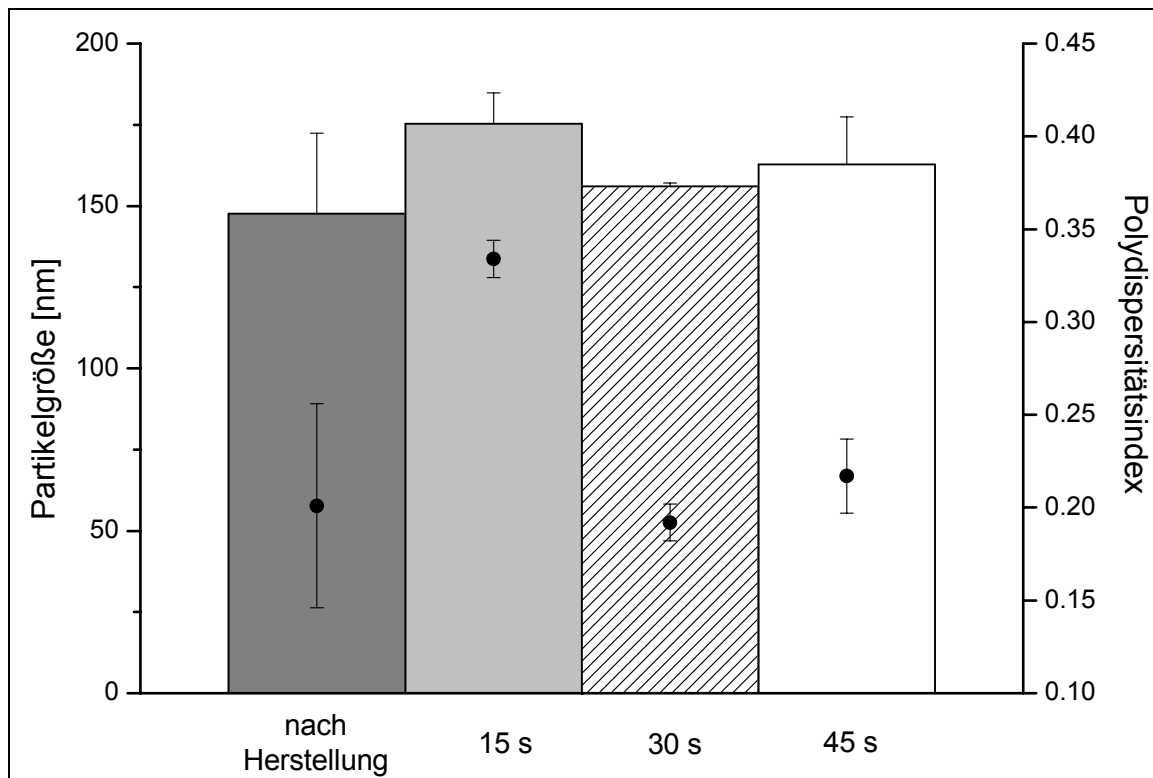


Abb. 4.40: PCS-Bestimmung von SLN ohne bzw. nach Mikrowellenbestrahlung (Mikrowellen Einwirkdauer 15, 30 bzw. 45 Sekunden bei 180 Watt), n=3.

4.6.3 Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an unkonservierten SLN

Unkonservierte SLN wurden auf ihre Sterilität und Sterilisierbarkeit überprüft. Über eine Lagerzeit von einem halben Jahr konnte keine Verkeimung der Probe mit anaeroben Bakterien, Hefen und Pilzen festgestellt werden. Da die Herstellungsmethode der Hochdruckhomogenisation mit einer erhöhten Belastung von Temperatur, Druck und Scherung gekoppelt ist, könnte auf diese Art und Weise schon während der Herstellung eine Keimminimierung stattfinden. Die versiegelte Probe könnte so ausreichend vor äußeren mikrobiellen Einflüssen geschützt sein. Eine Keimminderung wurde bisher beispielsweise durch Wasserentzug über eine Lyophilisierung der Nanosuspension erreicht [Cavalli et al. 1997].

Eine mit *E. coli* kontaminierte SLN-Probe wurde mit Hilfe von Mikrowellenstrahlung bearbeitet. Es fand eine Keimreduktion in der Probe statt, die einerseits durch die Mikrowellenstrahlung selbst bedingt sein, andererseits jedoch auch auf einem

thermischen Effekt der aufgeheizten Probe beruhen könnte. Janske konnte 1987 bereits eine Entkeimung pharmazeutischer Produkte durch Mikrowellen erreichen. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels sollten SLN untersucht werden, die vor bzw. nach der Homogenisation mit einem Protein beladen wurden.

4.7 Untersuchungen an Protein-beladenen SLN-Dispersionen am Beispiel von BSA und FITC-BSA

Zunächst wurden SLN-Dispersionen mit 10 bzw. 20 % P90H in der LM nach der Herstellung mit bovinem Serumalbumin (BSA) beladen. Partikelgrößenmessungen sollten einen Hinweis auf eine Oberflächenadsorption geben, die über eine Vergrößerung der Partikel erkannt werden sollte. Über eine indirekte Bestimmung der Beladungskapazität wurde zwischen ungebundenem und an den SLN adsorbiertem BSA unterschieden. Mit Hilfe einer fluorimetrischen Bestimmungsmethode wurden SLN mit fluoreszenzmarkiertem BSA beladen und direkt spektralfluorimetrisch vermessen. Mit FTIR-Messungen der Nanosuspension sollte eine Aussage über die Konformation der Sekundärstruktur des adsorbierten Proteins getroffen werden.

4.7.1 Partikelgrößenbestimmung

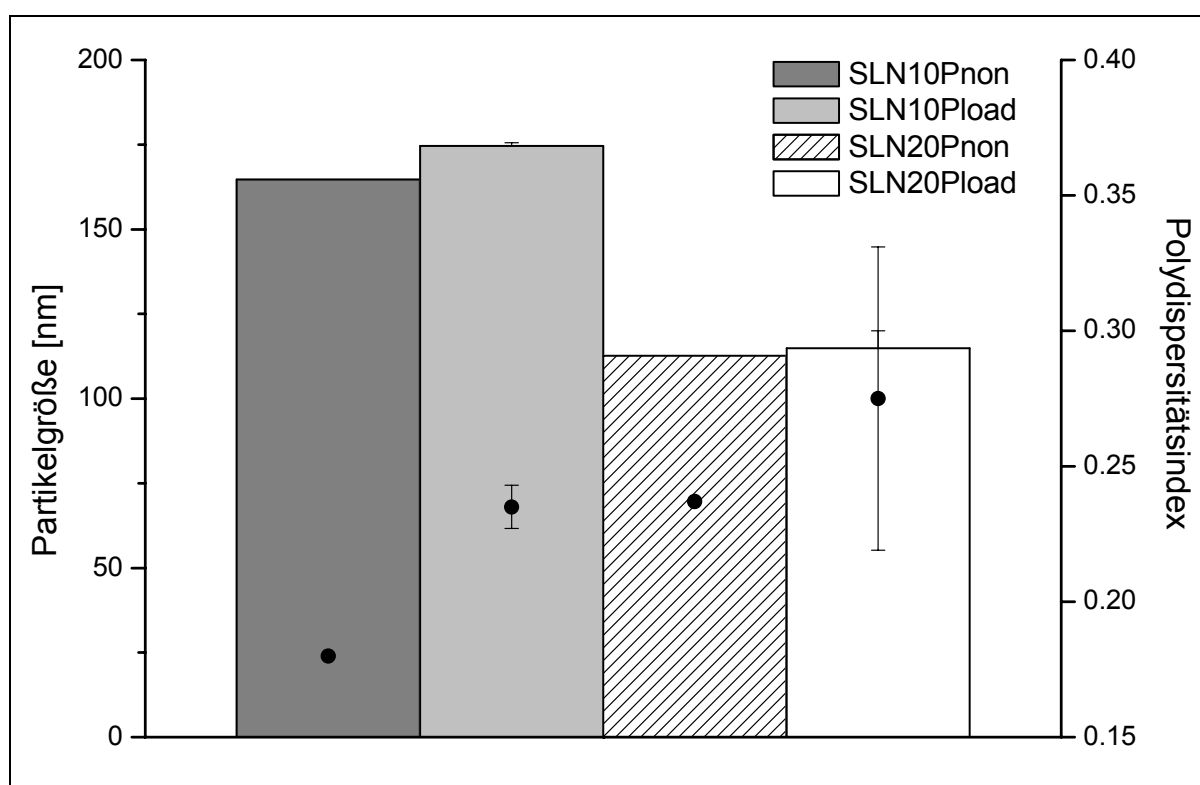


Abb. 4.41: PCS-Partikelgrößenbestimmung von proteinbeladenen (load) und unbeladenen (non) SLN mit 10 bzw. 20 % P90H und 1 % Solutol, n=3.

Beladene SLN zeigten eine tendenzielle Vergrößerung der Partikelgröße um ca. 5-10 nm wie in Abb. 4.41 dargestellt. Ob dieses Ergebnis auf eine Proteinanlagerung an den SLN zurückzuführen ist, sollte jedoch mit weiteren Untersuchungsmethoden belegt werden.

4.7.2 SLN-Beladungskapazität von BSA an SLN

In diesem Abschnitt wurde eine indirekte Methode verwendet, mit der man über eine Zentrifugation der beladenen Nanosuspension in Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 300.000 Da) ein Filtrat erhielt, das partikelfrei war und das gesamte ungebundene Protein enthielt. Die Partikel und adsorbiertes Protein wurden vom Filter zurückgehalten. Über eine Bradford-Gehaltsbestimmung des im Filtrat enthaltenen Proteins (Modellprotein BSA) konnte auf die Beladungskapazität der SLN zurück geschlossen werden. SLN-Dispersionen mit 10 und 20 % P90H in der LM (1 % Solutol) zeigten ähnliche Protein-Beladungseigenschaften. Mit dem Modellprotein BSA wurde für SLN mit 10 % P90H eine Beladungskapazität von 26,8 % erzielt. SLN mit 20 % P90H wiesen eine Beladungskapazität von 24,9 % mit BSA auf.

Die Methode ist sehr aufwendig und lässt keinen Rückschluss darüber zu, ob unter den angegebenen Bedingungen noch das natürliche Desorptions-Adsorptions-Gleichgewicht vorherrscht. Deshalb sollte eine direkte Methode entwickelt werden, die eine Aussage über die Proteinbeladungskapazität von SLN zulässt.

4.7.3 SLN-Beladungskapazität von FITC-BSA an SLN

Als Modellprotein wurde bei diesen Untersuchungen BSA verwendet, an das ein Fluorophor gebunden ist (FITC). Dieses so genannte gelabelte Protein zeigt in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 80 µg/mL eine Linearität der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration. In einer Kalibrierreihe wurde SLN-freies FITC-BSA in dem genannten Konzentrationsbereich mit dem Multiplattenreader Tecan (s. Kapitel 3.2.15.1) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm vermessen. Die erhaltene Kalibriergerade wurde nun mit einer Kalibrierreihe verglichen, die SLN und damit LM und FITC-BSA im Verhältnis von 5:1 (m/m) enthielt. Der Konzentrationsbereich lag auch hier bei 0-80 µg/mL an FITC-BSA. In der Abb. 4.42 werden diese Kalibriergeraden miteinander verglichen. Auffällig ist, dass FITC-BSA bei Anwesenheit von SLN mit 10 % P90H in der LM eine höhere Fluoreszenzintensität zeigt. Die Intensität bleibt dabei

proportional zur FITC-BSA-Menge. Untersuchungen an Systemen, die zwar SLN, aber kein FITC-BSA enthielten, konnten zeigen, dass die SLN keine Eigenfluoreszenz aufwiesen. Daher hätte man eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von FITC-BSA in Gegenwart der SLN erwarten können. Der überraschende Befund einer Intensitätszunahme ist möglicherweise in Zusammenhang mit der erfolgten Adsorption des Proteins an der SLN-Oberfläche zu sehen, bedarf aber weiterer Klärung. Die Aufklärung des Phänomens wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

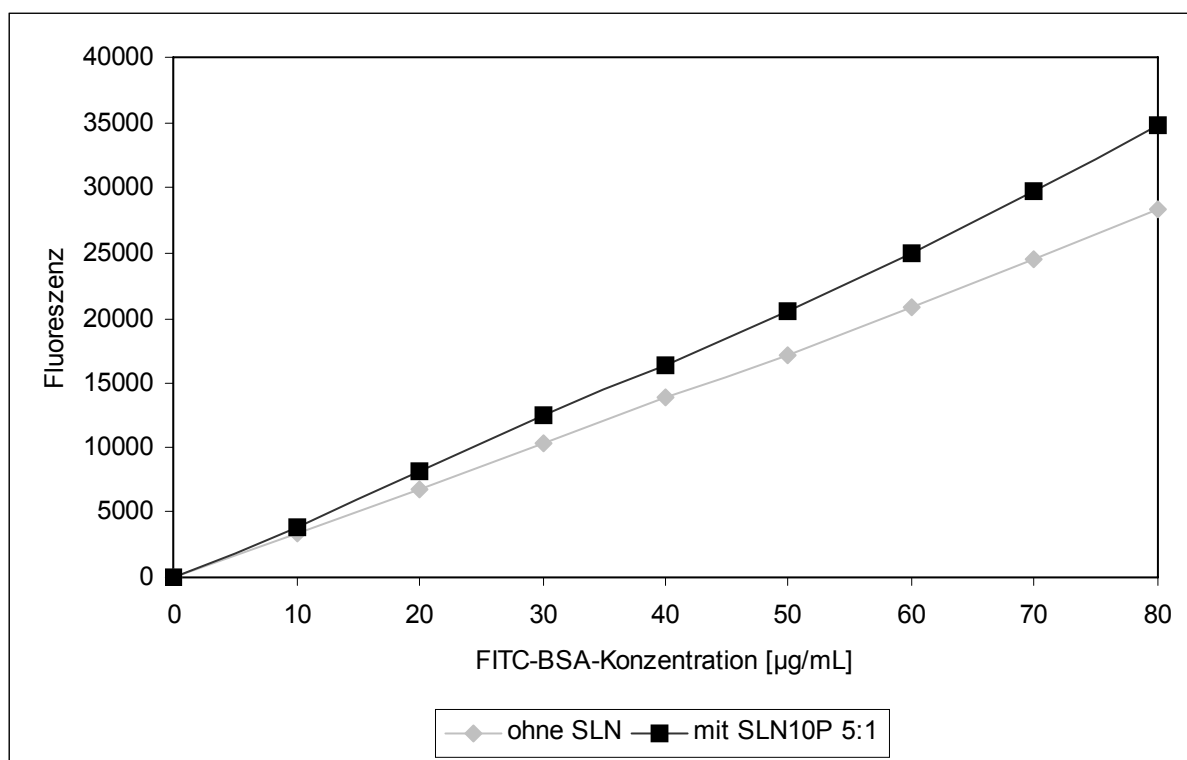


Abb. 4.42: Fluorimetrische Untersuchungen von FITC-BSA mit und ohne SLN mit 10 % P90H in der LM (SLN10P). Das Verhältnis SLN:FITC-BSA entspricht 5:1.

Um eine Zunahme der Fluoreszenzintensität durch eine Stokes-Verschiebung des Spektrums auszuschließen, wurde ein Emissionsspektrum einer FITC-BSA-Lösung mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ aufgenommen, welches mit einer FITC-BSA-Lösung derselben Konzentration mit SLN verglichen wurde. Das LM-Protein-Verhältnis lag bei 5:1 (m/m). In Abb. 4.43 sind Emissionsspektren mit einem Fluorimeter F-4500 (s. 3.2.15.1) bei Anregungswellenlängen von 484 bzw. 486 nm dargestellt. Die zuvor eingesetzte Anregungswellenlänge von 485 nm konnte mit diesem Fluorimeter nicht eingestellt werden. Aufgrund unterschiedlicher Empfindlichkeiten der beiden eingesetzten Fluorimeter (Tecan und F-4500) sind die

Ordinateneinteilungen der Fluoreszenzspektren unterschiedlich (Abb. 4.42 und Abb. 4.43). Das Emissionsmaximum verschob sich bei den betrachteten FITC-BSA-Lösungen mit bzw. ohne SLN nicht, so dass der Anstieg in der Intensität bei SLN-Anwesenheit nicht auf eine Stokes-Verschiebung, sondern auf den Adsorptionsvorgang des FITC-BSA an die SLN zurückgeführt werden kann. In der Abb. 4.43 wird deutlich, dass insbesondere bei einer Anregungswellenlänge von 484 nm die Fluoreszenzintensität von reinem FITC-BSA niedriger ist als die von mit SLN versetztem FITC-BSA. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität aufgrund einer Wechselwirkung von SLN und FITC-BSA scheint sehr wahrscheinlich.

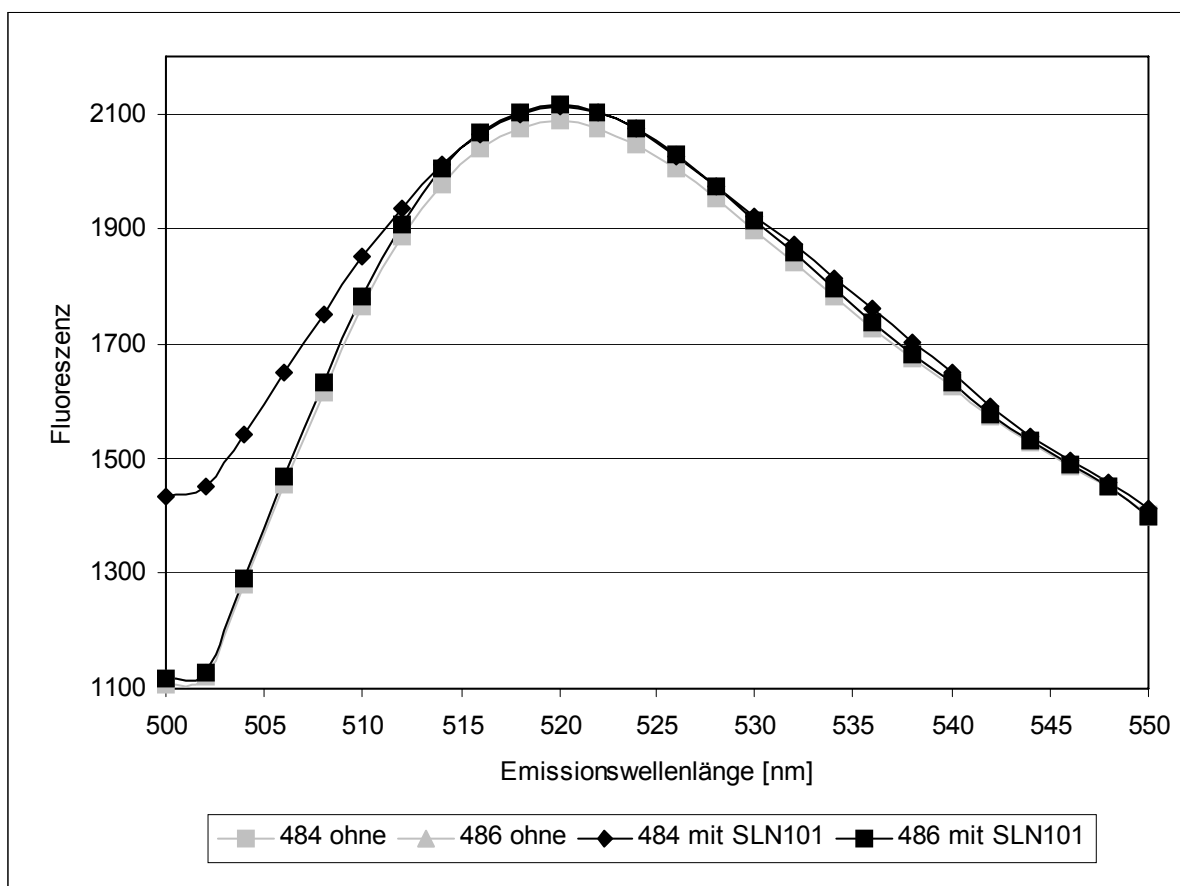


Abb. 4.43: Emissions-Fluoreszenzspektren von FITC-BSA mit und ohne SLN bei einer Anregungswellenlänge von 484 bzw. 486 nm. Die SLN-Dispersionen enthielten 10 % P90H in der LM (SLN101) und waren im Vergleich zum FITC-BSA im Verhältnis 5:1 enthalten.

In der Folge wurden die absoluten Fluoreszenzwerte der beiden Kalibriergeraden bzw. ihrer Bestgeraden aus Abb. 4.42 miteinander verglichen, indem der Wert ohne Anwesenheit von SLN gleich 100 % gesetzt wurde, da dieser den maximalen Fluoreszenzwert von freiem FITC-BSA darstellt. Der Fluoreszenzwert, der sich aus der Kalibriergeraden mit SLN in einem Verhältnis SLN:FITC-BSA von 5:1 ergab,

wurde auf diesen 100%-Wert bezogen, so dass ein Wert $> 100\%$ resultierte. Es ergab sich eine Differenz der beiden Werte von 21% , was als Beladungskapazität der SLN betrachtet wird. Dieser Wert liegt um 5% unter dem Wert, der bei der Vivaspin-Zentrifugation erreicht wurde.

Die Systeme, in denen 20% P90H in der LM vorhanden waren, ergaben eine Differenz der Fluoreszenzwerte von ca. 20% . Auch hier ergab sich eine Verringerung der Beladungskapazität um 5% zur in Kapitel 4.7.2 erzielten Beladungskapazität von BSA an SLN. Diese Abweichung der Beladungskapazitäten bei den unterschiedlichen Methoden könnte man damit erklären, dass sich möglicherweise das Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht des Proteins an die SLN in beiden Methoden unterscheidet. Außerdem ist eine Adsorption des BSA an den Filter der Vivaspin-Konzentratoren nicht auszuschließen. Dies hat wiederum eine Erniedrigung der Proteinkonzentration im Filtrat und somit eine Erhöhung der Beladungskapazität zur Folge. Mit der fluorimetrischen Methodik ist eine viel selektivere Bestimmung des FITC-BSA-Gehaltes nach Adsorption an die SLN möglich.

Im nächsten Abschnitt wurde eine FTIR-Analytik der Sekundärstruktur der adsorbierten Proteine BSA und FITC-BSA an SLN durchgeführt.

4.7.4 FTIR-Untersuchungen

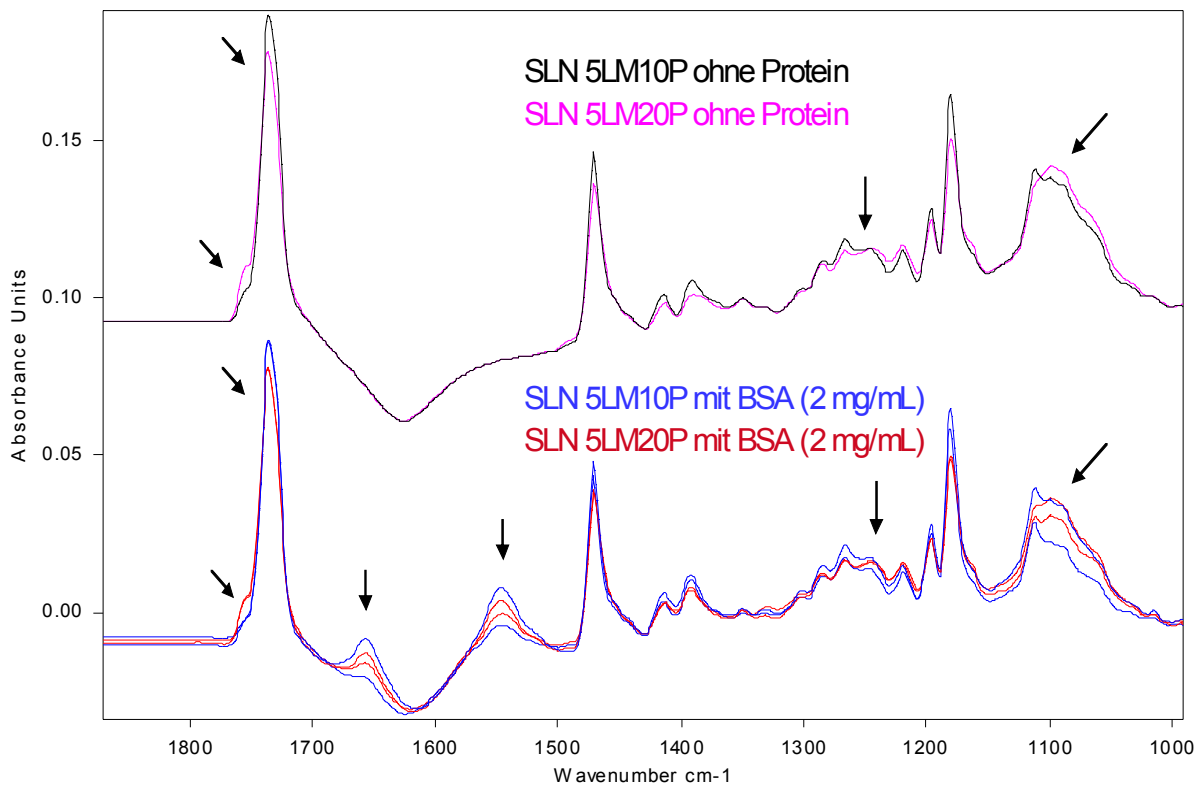


Abb. 4.44: Vergleich von FTIR-Spektren von SLN mit (unterer Abschnitt) und ohne adsorbiertes BSA (oberer Abschnitt). Die eingesetzten SLN-Dispersionen enthielten 5 % LM (m/m), die 10 bzw. 20 % P90H enthielten (5LM10P bzw. 5LM20P). Pfeile deuten auf Veränderungen hin.

Mit FTIR-Untersuchungen an Protein beladenen SLN sollte untersucht werden, ob eine Adsorption der Modellproteine BSA bzw. FITC-BSA eine Veränderung in der Sekundärstruktur bewirkt. FTIR-Untersuchungen sind generell in der unverdünnten SLN-Probe möglich. Über Veränderungen in der konformationsempfindlichen Amid I-Streckschwingung der Peptidbindung des nativen Proteins im Vergleich zum adsorbierten Protein können Denaturierungserscheinungen detektiert werden. α -Helix-Strukturen haben ihr Absorptionsmaximum bei ungefähr 1652 cm^{-1} , β -Faltblatt-Strukturen bei ca. 1630 und 1680 cm^{-1} und die random-coil-Strukturen im Bereich von 1645 cm^{-1} [Datenbank Bruker Optik, D-Ettlingen].

In Abb. 4.44 wurden FTIR-Spektren von SLN mit und ohne adsorbiertes BSA bei einem LM:BSA-Verhältnis von 25:1 betrachtet. Im oberen Teil der Abbildung sind proteinfreie Formulierungen mit 10 bzw. 20 % P90H in der LM miteinander verglichen worden. Die Pfeile in der Abb. 4.44 deuten auf Veränderungen im Spektrum hin. Es ließ sich ein nur minimaler Unterschied zwischen den beiden eingesetzten SLN-

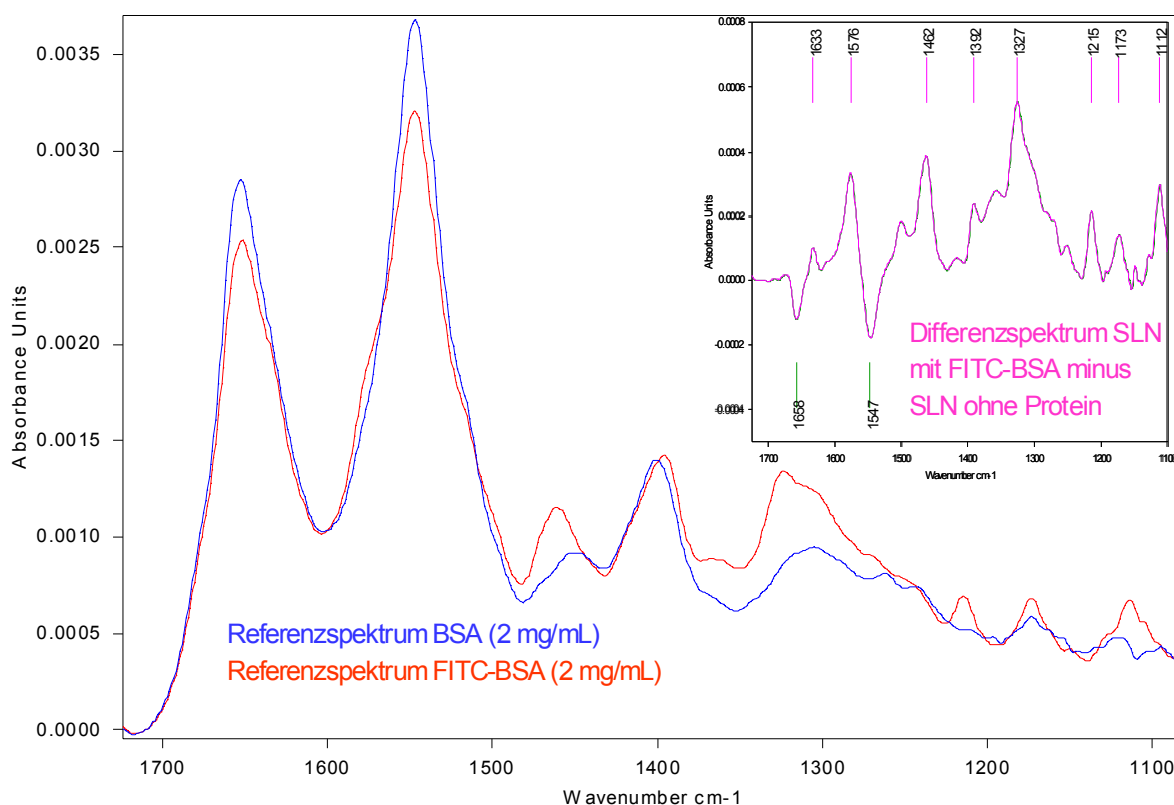


Abb. 4.45: FTIR-Spektren von SLN-freien Proteinlösungen mit 2 mg/mL BSA (blaue Kurve) bzw. FITC-BSA (rote Kurve). Im kleinen Fenster ist das Differenzspektrum von SLN mit FITC-BSA nach Subtraktion des reinen SLN-Spektrums abgebildet.

Proben feststellen. Im unteren Abschnitt der Abb. 4.44 sind die untersuchten Nanosuspensionen mit BSA beladen und erneut vermessen worden (je zweimal). Die Pfeile in der Abbildung zeigen Veränderungen im FTIR-Spektrum, die allerdings unabhängig von der Anwesenheit der Proteine sind (1770 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1100 cm^{-1}). Diese Veränderungen konnten nicht auf Veränderungen in α -Helix- und β -Faltblatt-Anteil zurückgeführt werden. Die geringen Unterschiede in den überlagerten Spektren waren ausschließlich auf die Anwesenheit verschiedener SLN in der Probe zurückzuführen. Die Unterschiede bei 1660 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} waren auf die Proteine zurückzuführen, allerdings unterschied sich nur die Intensität, aber nicht die Lage der Signale. Ein Einfluss der SLN-Dispersionen auf die Lage der Proteinsignale war demnach nicht gegeben. Dies wurde deutlich, wenn man die Spektren der proteinhaltigen Zubereitungen mit denen der proteinfreien verglich (s. Abb. 4.44, oberer Teil). Auch dort zeigten sich geringe Unterschiede der überlagerten Spektren bei denselben Wellenzahlen wie bei den proteinhaltigen

Zubereitungen. Die Sekundärstruktur des BSA scheint nach Adsorption an unterschiedlich zusammengesetzte SLN somit nicht verändert zu werden.

Um eine Aussage über die Struktur der eingesetzten Proteine machen zu können, wurde ein Spektrum von nativem FITC-BSA mit einem FTIR-Spektrum von nativem BSA verglichen (s. Abb. 4.45). Die eingesetzten Konzentrationen lagen bei 2 mg/mL. Die überlagerten Spektren waren aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der Proteine nicht deckungsgleich. Um den Einfluss der Interaktion von SLN und FITC-BSA auf die Sekundärstruktur des Proteins noch besser herausarbeiten zu können, wurde ein Differenzspektrum einer SLN-Dispersion mit und ohne FITC-BSA erzeugt. Bei 1658 cm^{-1} und 1547 cm^{-1} deuteten die Minima auf einen Verlust an α -Helix-Struktur hin. Eine Ausbildung eines Maximums bei ungefähr 1630 cm^{-1} ist wahrscheinlich auf eine Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen zurückzuführen. Die Anbindung eines Fluorophors (Fluoresceinisothiocyanat = FITC) an das BSA sorgte per se schon für eine Veränderung der Sekundärstruktur, die mit einer Verringerung an α -Helix- und einer Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen einherging. Ein chemisch verändertes Protein ist generell in Bezug auf seine Konformation nicht mit dem nativen zu vergleichen.

In der Folge wurde eine gezielte thermische Beanspruchung des BSA durchgeführt. Das Protein wurde auf $86\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und somit denaturiert. In Abb. 4.46 wurden Spektren von erhitztem BSA sowie mit BSA bzw. FITC-BSA beladenen SLN mit dem Spektrum des nativen BSA verglichen. Eine Intensitätsabnahme der Bande bei ungefähr 1652 cm^{-1} und eine Ausbildung einer Schulter im Bereich von 1630 cm^{-1} deuteten auf eine Verringerung von α -Helix- und eine Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen hin. Die erhitzte Probe diente als Referenz für eine denaturierte Probe, wohingegen die nicht erhitzte Probe von nativem BSA den unveränderten Zustand des BSA darstellte. Die mit FITC-BSA beladene Probe zeigte eine Intensitätsabnahme der Bande bei 1652 cm^{-1} und eine ansatzweise Ausbildung einer Schulter im Bereich von 1630 cm^{-1} . Diese Beobachtungen deckten sich tendenziell mit den Ergebnissen aus Abb. 4.45. Hier war allerdings eine veränderte Konformation mit Verlust an α -Helix- und einer Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen bei der partikelfreien FITC-BSA-Lösung zu erkennen. Die Proben, die, wie in Abb. 4.46 dargestellt, mit BSA beladen waren, zeigten untereinander keine merklichen Veränderungen, jedoch deutete sich im Vergleich zur nativen, nicht erhitzten und zu der erhitzten Proteinlösung eine mögliche Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen an. Diese tendenzielle Veränderung der Sekundärstruktur war allerdings nicht so

ausgeprägt wie bei der FITC-BSA-Probe. Eine Adsorption von Proteinen an Oberflächen kann, muss aber demnach nicht unbedingt eine Denaturierung des Proteins nach sich ziehen. Im Fall des FITC-BSA ist eine Veränderung der Sekundärstruktur im Vergleich zum nicht derivatisierten BSA bereits bei der nanopartikelfreien Proteinlösung erkennbar gewesen. Eine zusätzliche Konformationsveränderung des FITC-BSA nach Adsorption an die SLN ist nicht auszuschließen. Eine generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse von FITC-BSA auf BSA und umgekehrt ist generell nicht möglich, da die interindividuellen Konformationsunterschiede der Proteine im nativen Zustand schon zu sehr ausgeprägt sind.

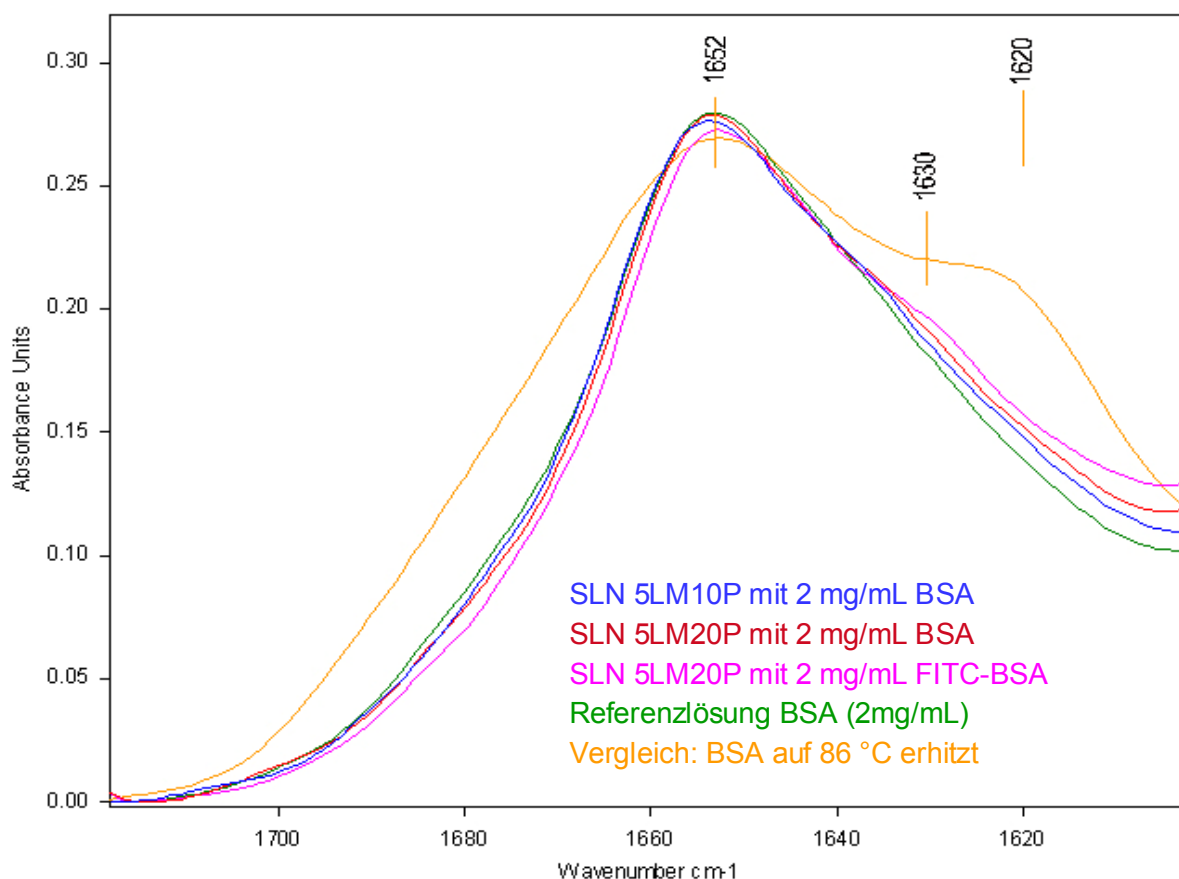


Abb. 4.46: Vergleich von SLN mit 10 (5LM10P) bzw. 20 % P90H (5LM20P) (5 % LM) mit BSA bzw. FITC-BSA mit einer per Temperaturrampe auf 86 °C gebrachten BSA-Lösung (orange Kurve). Als Referenzlösung fungierte eine native BSA-Lösung (2 mg/mL; grüne Kurve).

Im Großen und Ganzen waren die Ergebnisse für eine Arzneistoffadsorption an SLN jedoch viel versprechend, da eine deutliche Veränderung der Sekundärstruktur nach BSA-Adsorption nicht festgestellt werden konnte und das Modellprotein nach Adsorption der nativen Struktur unmittelbar entsprach.

4.8 Untersuchungen an Protein-beladenen SLN-Dispersionen am Beispiel von Insulin

In einer weiteren Versuchsreihe wurden SLN-Dispersionen mit 0,1; 0,2; 0,5; 1 und 3 % Insulin (alle m/m) beladen. Das Insulin wurde in diesem Fall bereits vor der Hochdruckhomogenisation in die geschmolzene LM eingearbeitet und mit dieser präemulgiert. Hierbei war es allerdings nur möglich, bis zu 0,1 % Insulin in die SLN-Dispersionen einzuarbeiten. Bei höheren Anteilen verlor die Zubereitung ihren Suspensionscharakter und ging in ein halbfestes System über.

Um festzustellen, ob das Protein dem thermischen Stress standhalten konnte, wurden die mit Insulin beladenen SLN-Dispersionen einer elektrophoretischen und circular dichrographischen Analyse unterworfen. Zunächst wurde die Partikelgröße der beladenen SLN-Dispersionen bestimmt.

4.8.1 Partikelgrößenbestimmung

In Abb. 4.47 ist eine Partikelgrößenbestimmung von mit Insulin beladenen bzw. unbeladenen SLN dargestellt. Die SLN-Dispersionen enthielten jeweils 10 % P90H in der LM (5 % Anteil), der Insulingehalt der Nanosuspension betrug bei den beladenen Systemen 0,1 % (m/m). Die Partikelgröße der SLN-Dispersionen wurde über einen Lagerzeitraum von 4 Wochen betrachtet. Es konnte beobachtet werden, dass die Partikelgröße der insulinhaltigen SLN im Vergleich zu den unbeladenen SLN abnahm. Unbeladene SLN zeigten eine Partikelgröße von ca. 150 nm, wohingegen die Anwesenheit des Insulins eine Partikelgrößenabnahme auf ca. 125 nm (nach einem Tag) bzw. 135 nm (nach einem Monat) bei immer noch monodisperser Verteilung bewirkte. Diese Partikelgrößenzunahme ist jedoch nicht signifikant ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung der Partikelgrößenverkleinerung von Insulin-beladenen SLN-Dispersionen im Vergleich zu den unbeladenen könnte darin liegen, dass die Nanopartikelsuspension bei Anwesenheit von Insulin möglicherweise besser stabilisiert werden kann, so dass die Dispergierung der Partikel effizienter stattfinden kann.

In der Folge wurde das vor der Homogenisation eingearbeitete Insulin mit Hilfe von CD und der diskontinuierlichen Elektrophorese auf seine Stabilität überprüft.

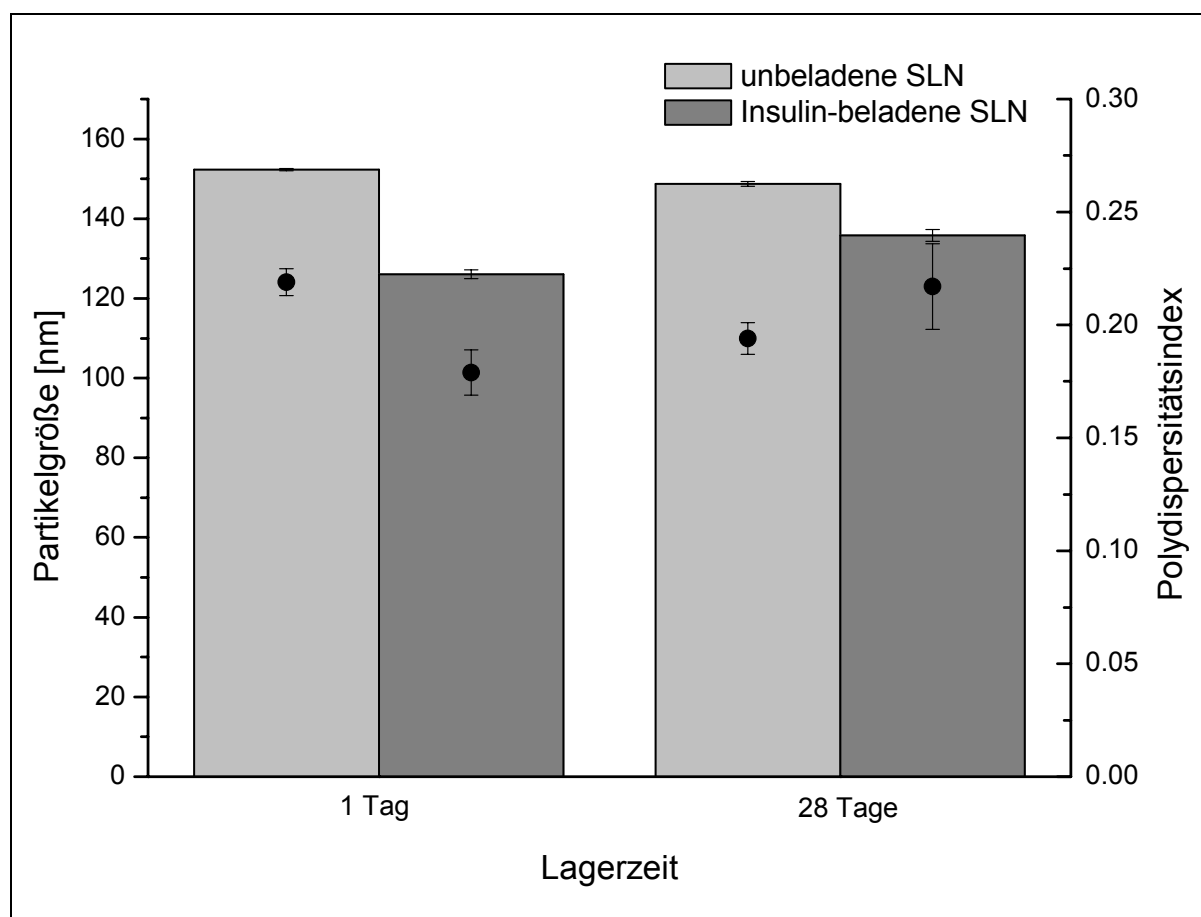


Abb. 4.47: PCS-Bestimmung von unbeladenen und mit Insulin beladenen SLN (0,1 % m/m) mit 10 % P90H bei RT gelagert (ein Tag bzw. 28 Tage nach Herstellung), n=3.

4.8.2 Diskontinuierliche Elektrophorese

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Elektrophorese ist es möglich, Proteine nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufzutrennen. In Abb. 4.48 ist ein Elektropherogramm abgebildet, das unterschiedliche Verarbeitungsweisen von Humaninsulin zeigt. Die beiden linken Banden (rot eingekreist) zeigen Insulin, das nach Einarbeitung in die 10 % P90H enthaltende Lipidschmelze homogenisiert worden war, in unterschiedlicher Probenkonzentration (Bande 1: 1:4-Verdünnung der Protein-beladenen Nanosuspension, Bande 2: 1:1-Verdünnung). Nicht homogenisiertes Insulin in wässriger Suspension wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen (türkis eingekreist von links nach rechts: 1 mg/mL (=Stammlösung), 1:20-Verdünnung der Stammlösung, 1:33,3-Verdünnung der Stammlösung). Es konnte kein Unterschied zwischen der nicht homogenisierten und der homogenisierten Insulinprobe festgestellt werden. Um eine Aussage darüber machen zu können, wie sich eine Denaturierung von Insulin im Elektropherogramm einer diskontinuierlichen Elektrophorese ausdrückt, wurde Insulin mit 0,1 %iger

Natriumhydroxidlösung gezielt und irreversibel denaturiert. Es konnten sechs weitere Banden neben der Hauptinsulinbande detektiert werden, die unterschiedliche Wanderungsstrecken zurücklegten. Eine andere Möglichkeit der Veränderung der Proteinstruktur sollte durch Erhitzen erzielt werden. Eine wässrige Insulinsuspension wurde ähnlich den Bedingungen bei der Hochdruckhomogenisation für ca. 10 Minuten auf 60 °C erhitzt (dunkelblau eingekreist: 1:1- und 1:2-Verdünnungen der Stammlösung). Es wurde eine weitere Bande detektiert, die auf einen Strukturverfall und eine Veränderung des Insulins nach Temperaturerhöhung hinweist. Zur genauen Struktur der Denaturierungsprodukte wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen vorgenommen. Als Vergleichsprobe zum Insulin wurde außerdem BSA elektrophoretisch aufgetrennt (schwarz eingekreist). BSA zeigte aufgrund

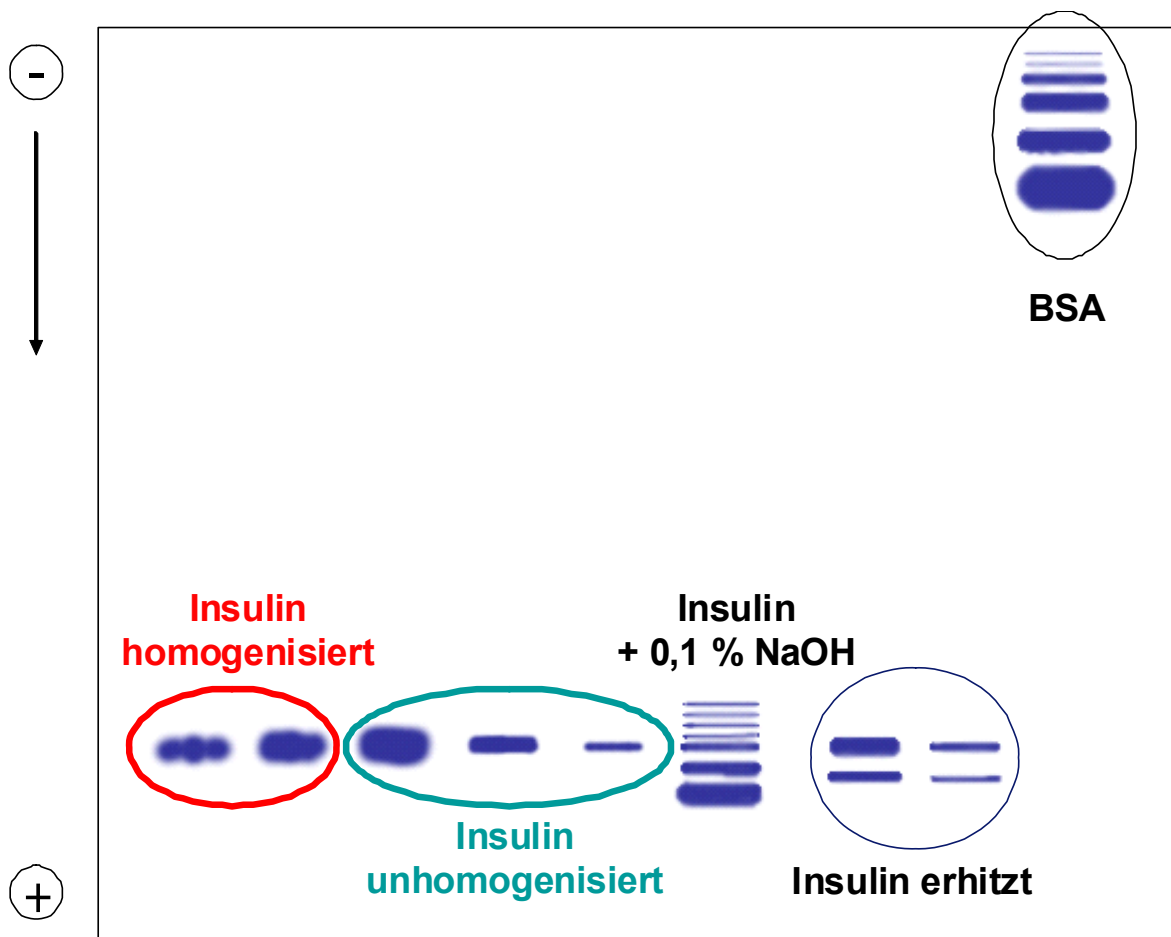


Abb. 4.48: Elektropherogramm einer diskontinuierlichen Elektrophorese von Humaninsulin vor und nach der Hochdruckhomogenisation bzw. nach Denaturierung durch Erhitzen und Laugenzusatz im Vergleich zu nativem BSA (Nachbildung des Originalelektropherogramms).

seines hohen Molekulargewichts ein völlig andersartiges Elektropherogramm bzw. zahlreiche Banden mit relativ kurzer Laufstrecke. Mit Hilfe der diskontinuierlichen Elektrophorese war eine Auftrennung von unterschiedlichen Proteinstrukturen und Denaturierungsprodukten problemlos möglich. Es konnte keine Veränderung der Insulinkonformation nach Hochdruckhomogenisation festgestellt werden, so dass Insulin in der Lipidschmelze offensichtlich ausreichend Schutz erhält, um nicht bei der hohen Verarbeitungstemperatur von 60 °C denaturiert zu werden.

In der Folge wurde mit circulardichrographischen Untersuchungen versucht, weitere Erkenntnisse über die Sekundärstruktur von homogenisiertem Insulin zu gewinnen.

4.8.3 CD-Untersuchungen

Mit Hilfe von CD ist eine Aufklärung von Sekundärstrukturveränderungen möglich. Es wurden ausschließlich die Veränderungen der α -Helixanteile betrachtet, weil diese genauer herausgearbeitet werden können als Veränderungen im β -Faltblattanteil.

Vor der circulardichrographischen Untersuchung wurde die Insulinsuspension (0,1 % m/m SLN-frei) nach bzw. ohne zuvorige Hochdruckhomogenisationsbehandlung mit Salzsäure auf pH 4,5 und so in Lösung gebracht. Es ergaben sich die in Tabelle 4.11 aufgeführten α -Helixanteile vor und nach der Homogenisation. Diese wurden mit Werten verglichen, die für natives Insulin mit FTIR erhalten wurden [Proteindatenbank Bruker Optik, D-Ettlingen]. Mit den CD-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die α -Helixanteile von homogenisiertem Insulin unter Berücksichtigung der Standardabweichung mit den Werten von nativem Insulin vergleichbar waren. Eine Standardabweichung von ca. 10 % ist für diese Methode nicht ungewöhnlich, da die Genauigkeit durch Schwankungen in dieser Größenordnung begrenzt ist. Die Ergebnisse waren überraschend, da mit Hilfe von CD ein Strukturabbau des Insulins nach Erhitzen nicht detektiert wurde, beim Elektropherogramm aus Abb. 4.48 jedoch eine Aufspaltung der Proteinbanden des erhitzten Insulins gezeigt worden ist. Es konnte elektropherometrisch ansatzweise gezeigt werden, dass Insulin in den SLN-Dispersionen die Strapazen aus dem Voremulgier- und Hochdruckhomogenisationsprozess überstehen konnte, ohne erkennbaren Schaden zu nehmen. Circulardichrographisch konnte sogar festgestellt werden, dass eine tendenzielle Zunahme der Insulin-Helixstruktur während der Homogenisation stattgefunden hat, und die Proteinstruktur somit stabilisiert werden konnte. Allerdings müssten die Ergebnisse aus den CD-Untersuchungen insofern kritisch hinterfragt werden, als mit der diskontinuierlichen Elektrophorese von

wässrigen Insulin-Suspensionen widersprüchliche Ergebnisse erzielt worden sind. Die Ergebnisse aus den CD-Untersuchungen sollten beispielsweise mit FTIR überprüft werden, da hier zusätzlich zu Veränderungen der α -Helixstruktur auch noch die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen genau erkannt werden kann.

Tabelle 4.11: α -Helixanteile einer Insulinlösung vor und nach der Hochdruckhomogenisation (mit CD bestimmt) im Vergleich zu nativem Insulin (mit FTIR bestimmt), n=3.

Probe	α -Helixanteil
natives Insulin (FTIR; pH 6,8)	43,2 %
Insulin (0,1 %; unhomogenisiert)	43,5 % $\pm 11,9$ %
Insulin (0,1 %; homogenisiert)	51,9 % $\pm 13,4$ %

4.8.4 Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Protein-beladenen SLN-Dispersionen

Im ersten Teil dieser Untersuchungen wurden zwei Methoden zur Bestimmung der Beladungskapazität von BSA an SLN gegenübergestellt. In einer direkten Methode wurde chemisch modifiziertes BSA (FITC-BSA), das ein Fluorophor enthielt, vor und nach Adsorption an SLN fluoreszenzspektroskopisch erfasst. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität von beladenen und unbeladenen SLN erlaubte einen Rückschluss auf die Beladungskapazität der SLN mit FITC-BSA. In einer Studie von Chen et al. (2004) wurde die Beladungskapazität von bioabbaubaren Mikropartikeln auf Polyglykol- und Polymilchsäure-Basis ebenfalls mit FITC-BSA untersucht.

In einer weiteren Methode zur Bestimmung der Beladungskapazität wurden mit BSA beladene SLN filtriert. Das partikelfreie Filtrat wurde anschließend einer Bradford-Gehaltsbestimmung unterzogen [Bradford 1976; Friedrich 2005]. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen unterschieden sich minimal voneinander, wobei eine mögliche Proteinadsorption der Protein-beladenen Nanopartikel im Filter der Konzentratoren unberücksichtigt geblieben ist und somit eine potentiell höhere Beladungskapazität erhalten wurde als bei der fluorimetrischen Bestimmung.

Mit FTIR-Experimenten wurde in der unverdünnten Nanosuspension eine Sekundärstrukturveränderung des Proteins nach Adsorption untersucht. Es konnte herausgearbeitet werden, dass sich das an die SLN adsorbierte BSA nicht

nennenswert von der nativen BSA-Struktur unterschied. Allerdings wurde deutlich, dass sich BSA und das chemisch modifizierte FITC-BSA in ihrer Sekundärstruktur unterschieden. Ergebnisse aus Proteinstudien sind somit nicht auf jedes beliebige Protein übertragbar und müssen spezifisch für jedes Protein neu generiert werden [Wang 2005].

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Lipidschmelzen vor der Hochdruckhomogenisation mit Insulin beladen. Das Insulin wurde anschließend mit CD und einer diskontinuierlichen Elektrophorese auf seine Stabilität getestet. Außerdem wurde die Partikelgröße der beladenen SLN mit PCS-Messungen bestimmt. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Partikel nahm im Vergleich zur unbeladenen SLN-Probe um ca. 25 nm ab. Der Grund für dieses Ergebnis könnte in der besseren Stabilisierbarkeit und Dispergierbarkeit der insulinhaltigen Partikel liegen, was mit einer Partikelverkleinerung einherging. Bei Untersuchungen von Attama et al. (2008) hatte beispielsweise eine Einarbeitung von Diclofenac-Natrium im Gegensatz dazu zu einer Partikelvergrößerung im Vergleich zur arzneistofffreien SLN-Dispersion geführt. CD- und Elektrophorese-Untersuchungen zeigten, dass das Insulin einer Hochdruckhomogenisation standhalten kann. Es könnte also durchaus möglich sein, thermostabile Proteinarzneistoffe bereits vor der Hochdruckhomogenisation einzuarbeiten. Diese Möglichkeit muss jedoch für jedes Protein im Vorfeld bestimmt werden.

5 Abschlussdiskussion

5.1 Untersuchung der LM

Für die Herstellung der SLN-Dispersionen werden zuvor produzierte und gelagerte LM benötigt, deren kristalliner Aufbau, d.h. deren stabile Modifikation bekannt sein und sich nach Fertigstellung nicht mehr verändern sollte, um so eine reproduzierbare Herstellung in Bezug auf die Einarbeitung oder Adsorption von Arzneistoffen gleichermaßen zu gewährleisten. Anlehnend an die Arbeiten von Martin Schubert, der LM und SLN-Dispersionen aus S154 und Phospholipon 90 G (P90G, s. Tabelle 2.1) entwickelte [Schubert et al. 2005], wurde in der vorliegenden Arbeit ein vollhydriertes, bei Raumtemperatur in geordnetem Zustand vorliegendes Phospholipid eingesetzt und eine physiko-chemische Charakterisierung der LM mit 0-60 % P90H vorgenommen. Kristallinitätsstudien ergaben in Analogie zu den Ergebnissen von Schubert mit steigendem Phospholipid-Gehalt einen Kristallinitätsverlust innerhalb der LM. WAXD-Untersuchungen zeigten sowohl bei LM mit P90G als auch in der vorliegenden Arbeit mit P90H, dass eine Rekristallisation bei RT zu einer verzögerten Ausbildung der von Hagemann beschriebenen stabilen β -Modifikation führte [Hagemann 1988]. DSC-Analysen zur verzögerten Modifikationsveränderung der LM mit unterschiedlichem P90H-Anteil konnten die Ergebnisse, die Schubert mit seinen P90G-LM erhalten hatte (bestätigt mit WAXD) untermauern. Exklusiv für die LM mit hydriertem Phospholipid wurde mit steigendem P90H-Gehalt nach einem Jahr Lagerzeit eine proportionale Aufweitung der Netzebenenabstände der LM beobachtet (SAXD). Eine mögliche Mischkristallbildung wurde in Kapitel 4.1 eingehend diskutiert. Ein Einbau von P90H in das S154-Kristallgitter scheint gegenüber einem P90G-Einbau begünstigt zu sein. Allerdings wurde bei beiden LM-Typen (S154 mit P90G oder P90H) auf Dauer ein Herausschleusen der Phospholipidkomponente aus dem Hartfettkristallgitter beobachtet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses Phänomen bei LM aus S154, P90H und Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) reduziert werden könnte; denn DMPC sollte als mittelkettiges Phospholipid gegebenenfalls in der Lage sein, sich strukturell passend in die LM aus S154 und P90H zu integrieren. S154 und P90H besitzen gesättigte Fettsäurereste mit einer Kohlenstoff-Kettenlänge von C16 und C18, wohingegen DMPC mit einer Fettsäurekettenlänge von C14 zur Gruppe der mittelkettigen, gesättigten Phospholipide gehört. DMPC ist in einer Veröffentlichung

auch in Kombination mit anderen Phospholipiden und Triglyceriden als Ausgangsstoff zur Bildung von Lipidnanopartikeln eingesetzt worden [Esposito et al. 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Röntgenuntersuchungen der S154-LM mit P90H und DMPC festgestellt werden, dass eine Interaktion der drei Komponenten stattgefunden hatte. Die Einstellung der stabilen Modifikation erfolgte unter DMPC-Einfluss bereits nach einem Monat, wohingegen es bei DMPC-freien Systemen mindestens 3 Monate dauerte, bis die stabile β -Modifikation gebildet wurde.

5.2 Untersuchungen der SLN

Aufbauend auf der physiko-chemischen Charakterisierung der LM mit S154 und P90H wurden SLN in unterschiedlichen Variationen und mit unterschiedlichen Konservierungsmitteln, LM-Anteilen und Emulgatorkonzentrationen hergestellt.

Im Vergleich zu SLN aus S154 und P90G konnten bei einem LM-Emulgator-Verhältnis von 5:1 ausreichend monodispers verteilte Nanosuspensionen hergestellt werden, sofern ein LM-Anteil von 5 % und ein P90H-Gehalt von 20 % in der LM nicht überschritten wurden. In bisherigen Veröffentlichungen wurden SLN-Dispersionen mit P90G hergestellt, die einen LM-Anteil von 15 % bei einer Emulgatorkonzentration von 3 % besaßen [Schubert et al. 2005]. Des Weiteren konnte in die Nanosuspensionen mit 15 % LM sogar bis zu 50 % P90G in die LM eingearbeitet werden. Dies war mit den SLN, die P90H als Phospholipidkomponente enthielten, nicht möglich. Hier konnten zwar 30 % P90H in die LM eingearbeitet und diese zu Nanoemulsionen homogenisiert werden, jedoch zeigten die während der Rekristallisation resultierenden Nanosuspensionen (5 % LM) eine Erhöhung der Viskosität, die zumeist in einem halbfesten Zustand endete. SLN-Dispersionen aus S154 und P90G, die einen fünfprozentigen LM-Anteil besaßen, zeigten gegenüber den SLN-Dispersionen mit P90H einige Unterschiede. So entstanden bei einem Mindestgehalt von 10 % P90G in der LM Nanosuspensionen mit einer Partikelgröße von ca. 260 nm [Schubert und Müller-Goymann 2005], wohingegen die P90H-haltigen SLN-Dispersionen Partikelgrößen im Bereich von 150 nm aufwiesen. Die 20 %igen Systeme unterschieden sich hinsichtlich ihrer Partikelgröße ebenfalls. SLN mit 20 % P90G in der LM zeigten nach Schubert eine Partikelgröße von ca. 155 nm, und SLN mit 20 % P90H in der LM lagen im Größenbereich von ca. 100 nm. SLN mit P90H in der LM deuteten im Vergleich zu Nanopartikeln mit P90G eine effizientere

Zerteilbarkeit der LM an, konnten dies jedoch nur bei einem LM-Anteil von 5 % und einem maximalen P90H-Gehalt von 20 % ermöglichen.

In DSC-Untersuchungen konnte bei SLN-Dispersionen mit P90H und P90G eine Schmelzpunktsdepression um ca. 4 °C herausgearbeitet werden [Schubert und Müller-Goymann 2005]. In Übereinstimmung mit ähnlichen Untersuchungsergebnissen von Siekmann und Westesen (1994) ist diese Erniedrigung der Schmelztemperatur der SLN-Dispersionen im Vergleich zu unbehandeltem Bulk wahrscheinlich auf den kolloidalen Charakter und das große Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen der Partikel zurückzuführen.

Bei Variierung der SLN-Herstellung erwies sich eine hohe thermische Belastung des Systems als unabdingbare Voraussetzung. Eine Homogenisation oberhalb des Schmelzpunkts der LM war die einzig praktikable Herstellungsmethode der SLN. Eine schmelzpunktnahe Hochdruckhomogenisation, wie von Friedrich praktiziert [Friedrich et al. 2003], konnte nicht durchgeführt werden, da im Zuge dieser Herstellungsweise eine Verstopfung des Hochdruckhomogenisators resultierte.

Eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration auf 3 % ging zwar einerseits mit einer Partikelgrößenreduktion einher, andererseits ist eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration unter dem Gesichtspunkt der physiologischen Verträglichkeit zu berücksichtigen. Eine ideale Nanosuspension sollte einen möglichst geringen Anteil an potentiell toxischen Bestandteilen wie Emulgatoren enthalten. Eine Erhöhung der Konzentration an grenzflächenaktivem Stabilisator (in diesem Fall Solutol) ist jenseits einer bestimmten Grenze bei parenteraler Anwendung nicht mehr tolerierbar [Müller und Olbrich 1999; Schubert und Müller-Goymann 2005]. Aus diesem Grund wurde in der Standardrezeptur auf eine noch kleinere Partikelgröße zugunsten einer potentiell besseren Verträglichkeit verzichtet und Solutol in einprozentiger Konzentration in die Wasserphase eingearbeitet.

Ein Ersatz des quecksilberhaltigen Konservierungsmittels Thiomersals, das eine äußerst geringe Wirkkonzentration von 0,005 % besitzt, war nicht möglich, da die getesteten Konservierungsmittelalternativen in 10- bis 100-fach höheren Konzentrationen eingesetzt werden müssen und so in Interaktion mit Formulierungsbestandteilen traten. Eine Alternative zum Konservierungsmittelzusatz wäre eine Strahlensterilisation mit Gammastrahlung, da diese Strahlen weder eine Veränderung der Hartfettmodifikation noch der Partikelgröße verursacht haben. Da der Prozess der Hochdruckhomogenisation unter erhöhten Temperatur- und Druckbedingungen durchgeführt wurde, wurde die Effizienz der Methode in Hinblick

auf keimmindernde Effekte bzw. eine potentielle Sterilisierbarkeit des homogenisierten Guts überprüft. Ein Keimwachstum von Anaerobiern, Hefen und Pilzen konnte selbst Monate nach der Herstellung der unkonservierten Nanosuspensionen nicht festgestellt werden. In Anlehnung an die Dissertation von Udo Janske im Jahre 1986 wurde die Mikrowellenstrahlung als mögliches Werkzeug zur Keimreduktion verwendet. In mit Keimen kontaminierten Proben konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Keimreduktion und der Dauer bzw. der Intensität der Mikrowellenstrahlung festgestellt werden. Ein thermischer Effekt durch Aufheizen der Probe könnte jedoch sicherlich auch einen Beitrag zur Keimreduktion leisten.

5.3 Proteinbeladung von SLN-Dispersionen

SLN-Dispersionen stellen ein geeignetes Arzneistoffträgersystem für Proteine dar [Almeida et al. 1997]. Aufgrund der Vielseitigkeit von Proteinarzneistoffen wurde im letzten Teil der Arbeit der Fokus auf die Beladung von SLN mit unterschiedlichen Proteinen vor bzw. nach der Hochdruckhomogenisation gerichtet.

In Untersuchungen zur Proteinbeladungskapazität von SLN wurde gemäß der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode vorgegangen [Friedrich 2005; Schubert und Müller-Goymann 2005]. In Konzentratoren wurde eine Trennung von beladenen Partikeln und freiem Protein im Filtrat vorgenommen. In den vorangegangenen Arbeiten konnte eine größenabhängige Veränderung der Beladungskapazität festgestellt werden. Je kleiner die Partikel und je größer die Oberfläche waren, umso höher war die Beladungskapazität der SLN. Bei SLN mit P90H war jedoch kaum ein Unterschied der Beladungskapazitäten der beiden Partikelsorten (10 und 20 % P90H in der LM) zu erkennen, wobei einzuschränken ist, dass ein Vergleich von nur zwei Nanosuspensionstypen für eine Linearitätsbewertung nicht sehr aussagekräftig ist. Dennoch war es möglich, eine Beladung der SLN zu erzielen. Außerdem war es in Bezug auf Protein-Adsorptionsuntersuchungen möglich, eine Methode zu entwickeln, mit der die Beladungskapazität von SLN mit dem Modellprotein BSA bzw. FITC-BSA direkt ermittelt werden konnte. Fluorimetrische Untersuchungen von mit FITC gelabeltem BSA, adsorbiert an SLN, zeigten eine Vergrößerung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur freien FITC-BSA-Lösung. SLN-Dispersionen, die 10 und 20 % P90H in der LM enthielten, besaßen eine Beladungskapazität von ca. 20 %. Diese Ergebnisse zur Beladungskapazität zeigten eine Verringerung der Werte um 5 % gegenüber der Methode einer indirekten Bestimmung über das nicht

adsorbierte Protein. Jedoch kann bei der indirekten Bestimmungsmethode eine Adsorption des Proteins an den Filter nicht ausgeschlossen werden, was eine Erniedrigung des Proteinanteils im Filtrat und somit eine Erhöhung der Beladungskapazität zur Folge hat. Dies würde erklären, wieso mit der direkten, selektiveren Bestimmung eine geringere Beladungskapazität bestimmt wurde. Da bei diesen Untersuchungen jedoch nicht das eigentliche Protein BSA, sondern ein Derivat (FITC-BSA) betrachtet wurde, sind die Ergebnisse aus dieser Studie nicht vollkommen auf nicht derivatisiertes BSA zu übertragen. Mit Hilfe von FTIR-Messungen konnte ein Unterschied in der Sekundärstruktur beider Proteine festgestellt werden. Eine Derivatisierung von BSA zu FITC-BSA ging mit einem Strukturverlust an Helixanteil einher. Die Adsorption beider Proteine an SLN zeigte jedoch kaum einen Einfluss auf die Sekundärstruktur, so dass diese Ergebnisse für die Beladung von SLN mit Proteinen als viel versprechend und positiv zu werten sind.

Da bei der Hochdruckhomogenisation das Zusammenspiel hoher Temperaturen, Druck- und Scherkräfte ausgenutzt wird, hält man eine Zerkleinerung thermolabiler Stoffe im ersten Augenblick für unmöglich [Jahnke 2001]. In einer Veröffentlichung aus der Arbeitsgruppe von Göpferich konnte eine Mikropartikelbeladung mit Insulin mit Hilfe der Hochdruckhomogenisation erfolgen, ohne dass das Protein seine Wirksamkeit in auffälliger Weise verändert hatte [Maschke et al. 2006]. In Kapitel 4.8 wurde daher Insulin vor der Hochdruckhomogenisation in die Lipidschmelze eingearbeitet. Nach erfolgter Hochdruckhomogenisation wurde mit CD- und Elektrophorese-Untersuchungen die Struktur des Insulins bestimmt. Im Elektropherogramm konnten sowohl nach Erhitzen als auch nach Laugenzusatz Degradationserscheinungen des Insulins festgestellt werden. Mittels CD war solch eine Veränderung der Insulinstruktur nicht eindeutig erkennbar. Mit PCS-Messungen wurde eine Interaktion des Insulins mit der LM deutlich, da eine signifikante Partikelgrößenverkleinerung der mit Protein-beladenen Partikeln stattgefunden hatte. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die festen Lipidnanopartikel eine schützende Funktion auf das eigentlich thermolabile Insulin ausgeübt haben müssen. Feste Lipidnanopartikel konnten ihre Eignung als Arzneistoffträgersystem für empfindliche Arzneistoffe zumindest in Bezug auf die Einarbeitung von Insulin vor der Homogenisation beweisen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in der Arbeitsgruppe mit einem vollkommen hydrierten Phospholipid (P90H) gearbeitet. Es wurden Lipidmatrices aus einem natürlichen Triglyceridgemisch, dem Hartfett S154, und P90H hergestellt und zu Nanosuspensionen (SLN) weiterverarbeitet. Aufbauend auf den Dissertationen von Ingo Friedrich und Martin Schubert wurden vergleichende Untersuchungen zu SLN mit Phospholipon 90 G, einem Phospholipid mit ungesättigten Fettsäureanteilen unternommen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass P90H und S154 in der Lipidmatrix (LM) zur Mischkristallbildung neigen. Allerdings wurde über eine bis zu zwölfmonatige Lagerzeit eine partielle Separierung des P90H aus der LM festgestellt. Da P90H in flüssigen Lipiden, wie mittelkettigen Triglyceriden (MKT) und Isopropylmyristat (IPM) nicht zu einer Bildung einer inversemizellaren Lösung geführt hat, wurden weitere potentiell lösungsverbessernde Komponenten hinzugefügt. Ein Phospholipid mittlerer Kettenlänge (DMPC) konnte zwar nicht lösungsvermittelnd in den besagten Lösungsmitteln wirken, in der LM hingegen, d.h. in einer Zusammensetzung aus P90H und S154, konnte das DMPC in die LM eingebaut werden und sorgte innerhalb eines Monats zur Ausbildung der stabilen β -Modifikation der LM. Ohne Zusatz dieser Komponente stellte sich die stabile Modifikation erst drei Monate nach der Herstellung ein.

SLN mit P90H konnten nur bei 10 bzw. 20 % P90H-Anteil in der LM hergestellt werden und dienten als Standardrezeptur im Vergleich zu Zubereitungen, bei denen verschiedene Parameter der Herstellung variiert wurden. Eine Veränderung der Zyklenzahl führte zwar zu keiner Verbesserung der Ergebnisse, insbesondere der Partikelgröße, zeigte aber, dass auch unter erhöhter thermischer Belastung die Fettsäure- und Phospholipid-Zusammensetzung nicht negativ im Sinne einer chemischen Zersetzung beeinflusst wurde. Eine Veränderung des LM-Anteils in den SLN zeigte, dass - unter Berücksichtigung der Konzentration des hydrophilen Emulgators Solutol HS 15 - bei einem Verhältnis Hartfett zum Emulgator von mehr als bzw. gleich 6:1 halbfeste Systeme entstanden. Diese zeigten nach Überschreiten der Fließgrenze ein plastisches Fließverhalten, das allerdings nicht dem rheologischen Verhalten eines klassischen Bingham-Körpers entspricht. Der Beweis, dass in den halbfesten Systemen noch individuelle Partikel vorhanden waren, konnte über TEM-Aufnahmen, aber auch über eine Redispergierung der halbfesten

Zubereitungen in einer wässrigen Solutol-Lösung über Ultraschall und eine anschließende Partikelgrößenbestimmung nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der LM auf mehr als 5 % in den SLN ergab keine überzeugende Verbesserung der Rezeptur. Bei einem P90H-Gehalt von mehr als 30 % in der LM blieben die Systeme nur über einen geringen Zeitraum stabil bzw. wiesen die Partikel zu große hydrodynamische Durchmesser (ca. 140 nm direkt nach Herstellung und 180 nm nach 4 Wochen) mit einer breiten Partikelgrößenverteilung (0,4-0,6) auf.

Mit Hilfe von Protein-Adsorptionsuntersuchungen war es möglich, eine Methode zu entwickeln, mit der die Beladungskapazität von SLN-Dispersionen am Beispiel des Modellproteins BSA indirekt ermittelt werden konnte. Mit Hilfe einer fluorimetrischen Methode konnte FITC-gelabeltes BSA nach Adsorption an SLN - ohne den Umweg einer Filtration durch Konzentratoren - direkt spektralfluorimetrisch vermessen werden. Allerdings war eine Verdünnung des partikulären Systems nötig, um Streueffekte zu vermeiden.

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde eine Analytik von Protein-beladenen SLN durchgeführt. FTIR-Untersuchungen gaben Aufschluss über die Sekundärstruktur von adsorbierten Proteinen (BSA und FITC-BSA) an SLN mit P90H. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Sekundärstruktur von FITC-BSA gegenüber dem nativen BSA hinsichtlich der α -Helix- und β -Faltblattanteile erwartungsgemäß unterschied. Es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass die Adsorption dieser Proteine an die SLN zu einer merklichen Veränderung der Sekundärstruktur führte. Diese Untersuchungsergebnisse können allerdings nicht auf jedes Protein übertragen werden, so dass diese Untersuchungen für jedes Protein, das eingesetzt werden soll, erneut durchgeführt werden und im Vergleich zum nativen Protein ausgewertet werden müssen.

In einer weiteren Studie wurden SLN vor der Hochdruckhomogenisation mit Insulin beladen, um auszutesten, inwiefern das in der Lipidmatrix dispergierte Protein auf erhöhten thermischen und hyperbaren Stress reagiert. Mit CD und einer diskontinuierlichen Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass aus den Nanopartikeln freigesetztes Insulin keine Veränderung der Sekundärstruktur aufzeigte. Es war gegenüber der Temperatur- und Druckerhöhung bzw. gegenüber der hohen Scherkraft des Hochdruckhomogenisationsvorgangs und der Ultra-Turrax-Behandlung außerordentlich resistent.

Feste Lipidnanopartikel mit P90H sind für den Einsatz als Arzneistoffträgersystem viel versprechend. Es ist möglich, SLN mit P90H vor und nach der Herstellung mit

Arzneistoffen - insbesondere Proteinen - zu beladen. Eine mikrobielle Kontamination war nach der Herstellung, aber auch nach einem halben Jahr Lagerzeit nicht festzustellen. P90H ist für den Einsatz in der SLN-Herstellung gut geeignet. Es eröffnet besonders im Bezug auf die Wirkstoffverarbeitung in den SLN interessante Ansätze, deren Weiterverfolgung auch in anderen Bereichen lohnenswert erscheint. Die einfache Handhabung des hydrierten Phospholipids (Pulverform; keine Kühlschranklagerung notwendig), aber auch die Resultate der physiko-chemischen Untersuchungen und der Proteinanalytik weisen hinsichtlich einiger Aspekte auf eine Überlegenheit von P90H gegenüber P90G bei der SLN-Herstellung hin.

7 Literaturverzeichnis

Agarwal, R., Katare, O.P., Vyas, S.P., Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antipsoriatic drug dithranol, *Int. J. Pharm.* 228 (2001) 43-52

Agarwal, R., Saraswat, A., Kaur, I., Katare, O.P., Kumar, B., A novel liposomal formulation of dithranol for psoriasis: Preliminary results, *J. dermat.* 29 (2002) 529-532

Allémann, E., Leroux, J.-C., Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34 (1998) 171-189

Allen, T.M., Liposomal Drug Formulations - Rationale for Development and What We Can Expect for the Future, *Drugs* 56 (1998) 747-756

Almeida, J.A., Runge, S., Müller, R.H., Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters, *Int. J. Pharm.* 149 (1997) 255-265

Almeida, J.A., Souto, E., Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 478-490

Arikan, S., Rex, J.H., Lipid-based antifungal agents: current status, *Curr. Pharm. Des.* 7 (2001) 393-415

Attama, A.A., Müller-Goymann, C.C., Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity, *Colloids Surfaces A* 315 (2007) 189-195

Attama, A.A., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., Diclofenac sodium delivery to the eye: In vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct, *Int. J. Pharm.* 355 (2008) 307-313

Attama, A.A., Schicke, B.C., Paepenmüller, T., Müller-Goymann, C.C., Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: Characterization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 48-57

Bangham, A.D., Horne, R.W., Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 660-668

Bauer, K.H., Frömmering, K.-H., Führer, C., Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie - Mit einer Einführung in die Biopharmazie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 7.Auflage (2002)

- Bekersky, I., Boswell, G.W., Hiles, R., Fielding, R.M., Buell, D., Walsh, T.J.,** Safety and Toxicokinetics of Intravenous Liposomal Amphotericin B (AmBisome®) in Beagle Dogs, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1694-1701
- Belazsovits, J.A., Mayer, L.D., Bally, M.B., Cullis, P.R., McDonell, M., Ginsberg, R.S., Falk, R. E.,** Analysis of the effect of liposomal encapsulation on the vesicant properties, acute and cardiac toxicities, and antitumor efficacy of doxorubicin, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 23 (1989) 81-86
- Bergström, C.A.S., Wassvik, C.M., Johansson, K., Hubatsch, I.,** Poorly soluble marketed drugs display solvation limited solubility, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 5858-5862
- Bhatia, A., Kumar, R., Katare, O.P.,** Tamoxifen in topical liposomes: Development, characterization and in-vitro evaluation, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 7 (2004) 252-259
- Bradford M.,** A rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254
- Bradford, G.S., Taylor, C.T.,** Omeprazole and vitamin B12 deficiency, *Ann. Pharmacother.* 33 (1999) 641-643
- Brandl, M., Bachmann, D., Drechsler, M., Bauer, K.H.,** Liposome Preparation by a New High Pressure Homogenizer Gaulin Micron Lab 40, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16 (1990) 2167-2191
- Cavalli, R., Bargoni, A., Podio, V., Muntoni, E., Zara, G.P., Gasco, M.R.,** Duodenal administration of solid lipid nanoparticles loaded with different percentages of tobramycin, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1085-1094
- Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M.E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R.,** Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 148 (1997) 47-54
- Cavalli, R., Caputo, O., Gasco, M.R.,** Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) R9-R12
- Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saettone, M.F.,** Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin, *Int. J. Pharm.* 283 (2002) 241-245

- Chen, J.-L., Yeh, M.-K., Chiang, C.-H.**, The mechanism of surface-indented protein-loaded PLGA microparticle formation: the effects of salt (NaCl) on the solidification process, *J. Microenc.* 21 (2004) 877-888
- Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H.D., Golomb, G.**, Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics, *J. Control. Rel.* 83 (2002) 389-400
- Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F.**, Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 2-13
- Couvreur, P., Vauthier, C.**, Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450
- Cox, E.H., Knibbe, C.A.J., Koster, V.S., Langemeijer, M.W.E., Tukker, E.E., Lange, R., Kuks, P.F.M., Langemeijer, J.J.M., Lie-A-Huen, L., Danhof, M.**, Influence of Different Fat Emulsion-Based Intravenous Formulations on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol, *Pharm. Res.* 15 (1998) 442-448
- Curri, S.B., Raso, M., Rossi, C.R.**, Die Anwendung der Dünnschichtchromatographie zum Nachweis von Fett- und Lipoidsubstanzen in Gewebsschnitten, *Histochemie* 4 (1964) 113-119
- Diederichs, J.E., Müller, R.H.**, Liposomen in Kosmetika und Arzneimitteln, *Pharm. Ind.* 56 (1994) 267-275
- Emami, J.**, In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications, *J. Pharm. Sci.* 9 (2006) 169-189
- Esposito, P., Chicco, D., Del Curto, M.D.**, Amphiphilic lipid nanoparticles for peptide and/or protein incorporation, *US-Patentschrift (CA2431888)* (2002)
- Fahr, A., Kissel, T.**, Mikropartikel und Implantate: Arzneiformen zur parenteralen Applikation, In: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1998) 243-258
- Fahrion, W.**, Fetthärtung, *Die Naturwissenschaften*, 22 (1916) 291-296
- Fonseca, M.J., van Winden, E.C.A., Crommelin, D.J.A.**, Doxorubicin induces aggregation of small negatively charged liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (1997) 9-17
- Friedrich, I.**, Entwicklung und Charakterisierung von Nanosuspensionen auf Basis erstarrter invers mizellarer Lösungen (SRMS) als ophthalmologisches Drug Delivery System, *Dissertation TU Braunschweig* (2005)

- Friedrich, I., Müller-Goymann, C.C.**, Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions, *Eur. J. Pharm.* 56 (2003) 111-119
- Friedrich, I., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C.**, Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS), *Int. J. Pharm.* 305 (2005) 167-175
- Gabizon, A., Price, D.C., Huberty, J., Bresalier, R.S., Papahadjopoulos, D.**, Effect of Liposome Composition and Other Factors on the Targeting of Liposomes to Experimental Tumors: Biodistribution and Imaging studies, *Cancer* 50 (1990) 6371-6378
- Gabizon, A., Shmeeda, H., Barenholz, Y.**, Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 419-436
- GareiB, J., Hoff, E., Ghyczy, M.** Phospholipide - Liposomen - Nanoemulsionen, *Parfum Kosmet* 10 (1994) 652-659
- GareiB, J., Hoff, E., Ghyczy, M.** Phospholipide - Liposomen - Nanoemulsionen. II.Effekte auf die Haut, *Parfum Kosmet* 11 (1995) 152-155
- Gasco, M.R.**, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, *US-Patentschrift* (5250236) (1993)
- Gasco, M.R.**, Solid lipid nanospheres from warm micro-emulsions, *Pharm. Technol. Eur.* 9 (1997) 52-59
- Gasco, M.R.**, Solid lipid nanoparticles for drug delivery, *Pharm. Technol. Eur.* 9 (2001) 32-42
- Gasco, M.R.**, Lipid nanoparticles: perspectives and challenges, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 377-378
- Glavaš-Dodov, M., Fredro-Kumbaradži, E., Calis, S., Goračinova, K., Mladenovska, K., Simonovska, M., Hincal, A.A.**, Formulation and characterisation of 5-Fluorouracil loaded liposomes, *Bull. Chem. Technol. Macedonia* 23 (2004) 13-18
- Glonek, T., Greiner, J.V., Korb, D.R.**, Dry eye treatment solution and method, *US-Patentschrift* (US 4914088) (1990)
- Göppert, M., Müller, R.H.**, Plasma Protein Adsorption of Tween 80- and Poloxamer 188-stabilized Solid Lipid Nanoparticles, *J. Drug Target.* 11 (2003) 225-231
- Göppert, M., Müller, R.H.**, Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns, *J. Drug Target.* 13 (2005) 179-187

- Gohla, S.H., Dingler, A.**, Scaling up feasibility of the production of solid lipid nanoparticles (SLNTM), *Pharmazie* 56 (2001) 61-63
- Gómez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V.**, Synthesis and characterization of spherical magnetite/biodegradable polymer composite particles, *J. Coll. Interface Sci.* 240 (2001) 40-47
- Griffiths, W.J.**, Tandem Mass Spectrometry in the Study of Fatty Acids, Bile Acids, and Steroids, *Mass Spec. Rev.* 22 (2003) 81-152
- Gunther, B.-R.**, Process for the separation of oils and/or phosphatidylethanolamine from alcohol soluble phosphatidylcholine products containing the same, *US-Patentschrift* (US 4452743) (1984)
- Hagemann, J.W.**, Thermal behavior and polymorphism of acylglycerides, in Garti, N., Sato, K. (Ed.), *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*, Marcel Dekker New York (1988) 29-67
- Harms, M.**, Röntgenuntersuchungen an kolloidalen Arzneiformen am Beispiel von: Oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikeln und Quil-A-Assoziaten, *Dissertation TU Braunschweig* (2008)
- Hauss, D.J., Fogal, S.E., Ficorelli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A., Keirns, J.J.**, Lipid-Based Delivery Systems for Improving the Bioavailability and Lymphatic Transport of Poorly Water-Soluble LTB₄ Inhibitor, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 164-169
- Heiati, H., Tawashi, R., Phillips, N.C.**, Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilisation, *J. Microenc.* 15 (1998) 173-184
- Hoppe, H.-U., Bökenkamp, D., Huang, S.**, Method for the production of phospholipids, *Internationale Patentschrift* (WO/2003/020941) (2003)
- Hou, D., Xie, C., Zhu, C.**, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), *Biomaterials* 24 (2003) 1781-1785
- Hu, L., Tang, X., Cui, F.**, Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 1527-1535
- Hu, F.Q., Yuan, H., Zhang, H.H., Fang, M.**, Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization, *Int. J. Pharm.* 239 (2002) 121-128
- Hussein, R., Müller-Goymann, C.C.**, Insulin-loaded Solid Lipid Nanoparticles based on Phospholipon[®] 90 H, *Poster CRS German Chapter Annual Meeting Braunschweig* (2008)

- Hüttenrauch, R., Speiser, P.,** In Vitro - in Vivo Correlation: An Unrealistic Problem, Pharm. Res. 3 (1985) 97-107
- Jahnke, S.,** The theory of high-pressure homogenization, in: Müller, R.H., Böhm Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2001) 7-30
- Janknecht, R., De Marie, S., Bakker-Woudenberg, I.A.J.M., Crommelin, D.J.A.,** Liposomal and lipid formulations of amphotericin B, Clin. Pharmacokinet. 23 (1992) 279-291
- Janske, U.,** Entkeimung und Entwesung pharmazeutischer Zubereitungen und Grundstoffe durch Mikrowellen, Dissertation TU Braunschweig (1987)
- Jenning, V.,** Feste Lipid-Nanopartikel (SLN[®]) als Trägersystem für die dermale Applikation von Retinol: Wirkstoffinkorporation, -freisetzung und Struktur, Dissertation FU Berlin (1999)
- Jenning, V., Schäfer-Korting, M., Gohla, S.,** Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, J. Control. Release 66 (2000) 115-126
- Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K.,** Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, J. Control. Release 95 (2004) 217-227
- Jores, K., Mehnert, W., Mäder, K.,** Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles (SLN) and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study, Pharm. Res. 20 (2003) 1274-1283
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hino, T., Niwa, T.,** Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998) 41-48
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolmann, J.,** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag Stuttgart 14.Auflage (1994)
- Keck, C.M., Müller, R.H.,** Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation, Eur. J. Pharm. Biopharm. 62 (2006) 3-16
- Komoroski, R.A., Pearce, J.M., Mrak, R.E.,** ³¹P-NMR-Spectroscopy of Phospholipid Metabolites in Postmortem Schizophrenic Brain, Magn. Reson. Med. 59 (2008) 469-474

- Kreuter, J., Petrov, V.E., Kharkevich, D.A., Alyautdin, R.N.,** Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles, *J. Control. Rel.* 49 (1997) 81-87
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C.C.,** Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 125 (1995) 231-242
- Liedtke, S., Wissing, S., Müller, R.H., Mäder, K.,** Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 183-185
- Lippacher, A., Müller, R.H., Mäder, K.,** Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 561-567
- Losch, R., Günther, B.R., Hager, J.,** Phospholipids container composition, *Europäische Patentschrift (EP 0 521 398 B1)* (1998)
- Lu, B., Xiong, S.B., Yang, H., Yin, X.D., Chao, R.B.,** Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases, *Eur. J. Pharm. Sci.* 28 (2006) 86-95
- Mangold, H.K.,** Thin-layer chromatography of lipids, *J. Amer. Oil Soc.* 38 (1961) 708-712
- Manjunath, K., Ready, J.S., Venkateswarlu, V.,** Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27 (2005) 127-144
- Martin, A.N.,** *Physikalische Pharmazie*, Hrsg. Leuenberger, 4.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2003) 601
- Maschke, A., Calí, N., Appel, B., Kiermaier, J., Blunk, T., Göpferich, A.** Micronization of Insulin by High Pressure Homogenization, *Pharm. Res.* 23 (2006) 2220-2229
- Massing, U., Fuxius, S.,** Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness, *Drug Resist. Upd.* 3 (2003) 171-177
- Medina, O.P., Zhu, Y., Kairamo, K.,** Targeted liposomal drug delivery in cancer, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 2981-2989
- Mehnert, W., Mäder, K.,** Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 165-196

- Mehnert, W., zur Mühlen, A., Dingler, A., Weyhers, H., Müller, R.H.,** Solid Lipid Nanoparticles - ein neuartiger Wirkstoff-Carrier für Kosmetika und Pharmazeutika (2.Mitteilung: Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung und Sterilisierbarkeit), Pharm. Ind. 59 (1997) 511-514
- Mezei, M., Meisner, D.,** Liposomes and Nanoparticles as ocular drug delivery systems, In: Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery CRC Press, Boca Raton (1993) 91-103
- Milne, G.L., Porter, N.A.,** Separation and Identification of Phospholipid Peroxidation Products, Lipids 36 (2001) 1265-1275
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C.,** Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice, Pharmacol. Rev. 53 (2001) 283-318
- Molineux, G.,** Pegylation: Engineering Improved Biopharmaceuticals for Oncology, Pharmacotherapy 23 (2003) 3S-8S
- Müller, R.H., Hildebrand, G.E.,** Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Lehrbuch für Studierende der Pharmazie - Nachschlagewerk für Apotheker in Offizin, Krankenhaus und Forschung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2. Erweiterte Auflage (1998)
- Müller, R.H., Lucks, S.,** Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen (feste Lipidnanosphären (SLN)), Europäische Patentschrift (EP 0 605 497 B1) (1996)
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S.,** Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery - A Review of the Start of the Art, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 161-177
- Müller, R.H., Mehnert, W., Lucks, J.-S., Schwarz, C., zur Mühlen, A., Weyhers, H., Freitas, C., Rühl, D.,** Solid Lipid Nanoparticles (SLN) - An Alternative Colloidal Carrier System for Controlled Drug Delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (1995) 62-69
- Müller, R.H., Olbrich, C.,** Solid Lipid Nanoparticles: Phagocytic Uptake, in vitro Cytotoxicity and in vitro Biodegradation, Pharm. Ind. 61 (1999) 462-467
- Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A.,** Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, ADDR 54 (2002) 131-155
- Müller, R.H., Rühl, D., Runge, S.A.,** Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time, Int. J. Pharm. 144 (1996) 115-121

- Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y.,** Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *Int. J. Pharm.* 187 (1999) 143-152
- Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y.,** Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behaviour, *J. Control. Rel.* 25 (1993) 89-98
- Noble, S., Markham, A.,** Cyclosporin: A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral®), *Drugs* 50 (1995) 924-941
- O'Brien, M.E.R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C.,** Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer, *Ann. Oncol.* 15 (2004) 440-449
- Panyam, J., Labhasetwar, V.,** Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 329-347
- Papantoniou, I., Müller-Goymann, C.C.,** Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystal on sustained drug release. Part I: Physicochemical characterization of systems containing either diclofenac acid or diclofenac sodium, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 5 (1995) 28-31
- Parsons, R.L.,** Drug Absorption in Gastrointestinal Disease With Particular Reference to Malabsorption Syndromes, *Clin. Pharmacokin.* 2 (1977) 45-60
- Patil, R.R., Guhagarkar, S.A., Devarajan, P.V.,** Engineered nanocarriers of doxorubicin: A current update, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 25 (2008) 1-61
- Phospholipid GmbH,** Sicherheitsdatenblätter und Produktinformationen zu den Produkten Phospholipon 80, 80H, 85G, 90G, 90H, 100H (1997)
- Polli, J.E., Crison, J.R., Amidon, G.L.,** Novel Approach to the Analysis of in Vitro-in Vivo Relationships, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 753-760
- Priano, L., Esposti, D., Esposti, R., Castagna, G., De Medici, C., Fraschini, F., Gasco, M.R., Mauro, A.,** Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) 1-6
- Reinhard, E., Schultz, J.,** Pharmazeutische Biologie 1 - Cytologie, Genetik, Physiologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2.Auflage (1980)

- Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss, A., Casabo, V.G.,** Pharmacokinetics in Drug Discovery, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 654-690
- Sah, H.,** Ethyl-formate - alternative dispersed solvent useful in preparing PLGA microspheres, Int. J. Pharm. 195 (2000) 103-113
- Samad, A., Sultana, Y., Aqil, M.,** Liposomal drug delivery systems: an update review, Curr. Drug Deliv. 4 (2007) 297-305
- Schmitt, J.,** Parenterale Fettesmulsionen als Arzneistoffträger, In: Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1998) 189-194
- Schöler, N., Olbrich, C., Tabatt, K., Müller, R.H., Hahn, H., Liesenfeld, O.,** Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages, Int. J. Pharm. 231 (2001) 57-67
- Schöler, N., Zimmermann, E., Katzfey, U., Hahn, H., Müller, R.H., Liesenfeld, O.,** Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages, Int. J. Pharm., 196 (2000) 235-239
- Schreier, H.,** Liposomen - ein neuartiger Arzneistoffträger, Pharm. Unserer Zeit 4 (1982) 97-108
- Schubert, M.A., Harms, M., Müller-Goymann, C.C.,** Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin, Eur. J. Pharm. Sci. 27 (2006) 226-236
- Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C.,** Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - Evaluation of the method and process parameters, Eur. J. Pharm. Biopharm. 55 (2003) 125-131
- Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C.,** Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier, Eur. J. Pharm. Biopharm. 61 (2005) 77-86
- Schubert, M.A., Schicke, B.C., Müller-Goymann, C.C.,** Thermal analysis of the crystallization and melting behaviour of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin, Int. J. Pharm. 298 (2005) 242-254
- Schwarz, C., Mehnert, W.,** Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 157 (1997) 171-179
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S., Müller, R.H.,** Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery. I. Production, Characterization and Sterilization, J. Control. Rel. 30 (1994) 83-96

- Schwarz, C., Mehnert, W., Müller, R.H.**, Lyophilization of solid lipid nanoparticles (SLN), *Eur. J. Pharm. Sci.* 2 (1994) 177
- Senior, J.H.**, Fate and behaviour of liposomes in vivo. A review of controlling factors, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3 (1987) 123-193
- Sershen, S., West, J.**, Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 1225-1235
- Shenoy, V.S., Vijay, I.K., Murthy, R.S.R.**, Tumor targeting: biological factors and formulation advances in injectable lipid nanoparticles, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 127-144
- Siekmann, B., Westesen, K.**, Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles, *Colloids Surfaces B* 3 (1994) 159-175
- Siekmann, B., Westesen, K.**, Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3 (1994) 194-197
- Siekmann, B., Westesen, K.**, Investigation on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43 (1996) 104-109
- Siekmann, B., Westesen, K.**, Submicron lipid suspensions (solid lipid nanoparticles) versus lipid nanoemulsions: similarities and differences, In: *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, Harwood, Amsterdam (1998) 205–218
- Singer, S.J., Nicolson, G.L.**, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* 175 (1972) 720-731
- Sjöström, B., Bergenstahl, B.**, Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 53-62
- Smith, A., Hunneyball, I.M.**, Evaluation of poly(lactic acid) as a drug biodegradable drug delivery system for parenteral administration, *Int. J. Pharm.* 138 (1996) 85-94
- Song, C., Lygre, H., Nerdal, W.**, Articaine interaction with DSPC bilayer: A ^{13}C and ^{31}P solid-state NMR study, *Eur. J. Pharm. Sci.* 33 (2008) 399-408
- Tabatt, K.**, Pharmazeutisch-biotechnologische Anwendungen von Festen Lipidnanopartikeln (SLN) - Vakzinadjuvantien und Gentransfervehikel, Dissertation FU Berlin (2002)
- Takeshi, F., Nobuyuki, T., Yoshiro, N.**, Production of powdered egg yolk lecithin, *Japanische Patentschrift (JP02172994A)* (1990)

- Taki, T., Kasama, T., Handa, S., Ishikawa, D.,** A Simple and Quantitative Purification of Glycosphingolipids and Phospholipids by Thin-Layer Chromatography Blotting, *Anal. Biochem.* 223 (1994) 232-238
- Thiele, W.O.,** Lipide, Isoprenoide mit Steroiden, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1979)
- Thoma, K., Serno, P.,** Beziehungen zwischen der Schmelzzeitzunahme von Suppositorien und den Eigenschaften der Hartfettgrundmasse. 6. Mitteilung über pharmazeutische Probleme bei Suppositorien, *Pharm. Ind.* 45 (1983) 192-196
- Thoma, K., Serno, P., Precht, D.,** Röntgendiffraktometrischer Nachweis der Polymorphie von Hartfett. 7. Mitt. über pharmazeutische Probleme bei Suppositorien, *Pharm. Ind.* 45 (1983) 420-425
- Torchilin, V.P.,** Liposomes as targetable drug carriers, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 2 (1985) 65-115
- Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O.,** Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 153-160
- Trotta, M., Gallarate, M., Pattarino, F., Morel, S.,** Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions, *J. Control. Rel* 76 (2001) 119-128
- Villalobos-Hernandez, J.R., Müller-Goymann, C.C.,** Physical stability, centrifugation tests and entrapment efficiency studies of carnauba wax-decylolate nanoparticles used for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 115-127
- Voigt, R.,** Pharmazeutische Technologie - Für Studium und Beruf, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart 10. Auflage (2006)
- Wagner, H.,** Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und Analytik von Phosphatiden und Glykolipiden, *Fette - Seifen - Anstrichmittel*, 12 (1960) 1115-1123
- Wang, W.,** Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int. J. Pharm.* 289 (2005) 1-30
- Weber, E.J.,** Compositions of commercial corn and soybean lecithins, *JAOCS* 58 (1981) 898-901
- Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K., Helgason, T., Awad, T.,** Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components, *Food Biophys.* (2008) 1-9

- Westesen, K., Bunjes, H., Koch, H.J.,** Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Control. Rel.* 48 (1997) 223-236
- Westesen, K., Siekmann, B.,** Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 151 (1997) 35-45
- Weyhers, H.,** Feste Lipidnanopartikel (SLN) für die gewebsspezifische Arzneistoffapplikation - Herstellung und Charakterisierung oberflächenmodifizierter Formulierungen, Dissertation FU Berlin (1995)
- Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H.,** Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1257-1272
- Wissing, S.A., Müller, R.H.,** Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, *J. Control. Rel.* 81 (2002) 225-233
- Zara, G.P., Cavalli, R., Bargoni, A., Fundarò, A., Vighetto, D., Gasco, M.R.,** Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin loaded lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and in other tissues, *J. Drug Target.* (2002) 327-335
- Zimmer, A., Atmaca-Abdel Aziz, S., Gilbert, M., Werner, D., Noe, C.R.,** Synthesis of cholesterol modified cationic lipids for liposomal drug delivery of antisense oligonucleotides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47 (1999) 175-178
- Zimmermann, E., Schöler, N., Katzfey, U., Müller, R.H., Hahn, H., Liesenfeld, O.,** Aseptic production of pyrogene-free aqueous solid lipid nanoparticles (SLNTM) dispersions for parenteral administration, *Proceed. Control. Rel. Soc.* 26 (1999) 593-594
- Zur Mühlen, A., Schwarz, C., Mehnert, W.,** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 299-307
- Zur Mühlen, A., Mehnert, W.,** Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles, *Pharmazie* 53 (1998) 552-555